



GRADO EN BIOLOGÍA

Curso Académico 2023/24

Trabajo de Fin de Grado

**Análisis de la actividad melaninolítica y
potencial biotecnológico de aislados
provenientes de plumas de *Sturnus
unicolor***

Autora: Sandra Jiménez Requena

Tutora URJC: María del Pilar Martínez Hidalgo

Índice.

1. Resumen
2. Introducción
3. Materiales y métodos
 - 3.1. Degradación en medio líquido
 - 3.2. Crecimiento con melanina como única fuente de carbono
 - 3.3. Análisis estadístico
4. Resultados
 - 4.1. Degradación en medio líquido
 - 4.1.1. Efecto del color
 - 4.1.2. Efecto del pH
 - 4.1.3. Pruebas fenotípicas
 - 4.2. Crecimiento con melanina como única fuente de carbono
5. Discusión y conclusiones
 - 5.1. Efecto del color
 - 5.2. Efecto del pH
 - 5.3. Pruebas fenotípicas
 - 5.4. Melanina como única fuente de carbono
 - 5.5. Conclusiones y futuras líneas
6. Bibliografía

1. Resumen.

Hoy en día los restos de la industria avícola llenan gran parte de los vertederos en todo el mundo. Estos restos incluyen huesos, vísceras y plumas. Las plumas son unas estructuras formadas por melanina y queratina, ambas moléculas muy estables y resistentes a la degradación. En este estudio, se pretende evaluar la capacidad de degradación de plumas de 15 cepas bacterianas, aisladas previamente del plumaje de *Sturnus unicolor*, en función del color de la pluma y del pH del medio, con el objetivo de valorar si estas variables afectan a la capacidad degradativa y a la velocidad de la degradación. De manera adicional, se quiere comprobar la capacidad melaninolítica de las mismas 15 cepas mediante siembra en tinta de calamar, cuyo componente principal es la melanina. Todas las cepas han mostrado crecimiento en tinta de calamar y capacidad de degradación de plumas, siendo el resultado más notable el de *Nocardiopsis alkaliphila*, posiblemente por su capacidad de formación de biofilm. En cuanto al pH, tiene una correlación significativa (p valor $<0,05$) con la degradación de la pluma. El color, por otra parte, parece no tenerla (p valor $>0,05$), lo que no concuerda con la bibliografía anterior. Es necesario pues investigar más acerca del papel de la melanina como pigmento protector, y podría ser interesante también estudiar el potencial biotecnológico de *Nocardiopsis alkaliphila* como bacteria para degradar algunos tipos de residuos, principalmente procedentes de la industria avícola.

2. Introducción.

Las plumas son estructuras de enorme importancia para las aves, ya que les sirven (entre otras cosas) para el vuelo como para, en muchas especies, señalar su condición individual y conseguir pareja durante la época de reproducción. Están compuestas principalmente por beta-queratina, con función estructural, y melanina, con funciones de pigmentación y protección (Goldstein, 2004), ambas moléculas con estructuras muy estables. En menor medida, contienen agua y lípidos (Pough, 1999). Asociada a las plumas, existe una microbiota que, en ciertos casos, parece tener capacidad para degradarlas (Burt, 1999)

Actualmente, debido a la enorme demanda de productos avícolas (ya que la carne de pollo es consumida a escala global), nos encontramos frente a un problema de tratamiento de residuos, porque la industria aviar produce enormes cantidades de plumas, los cuales no se degradan en las condiciones habituales producidas en los vertederos. En la actualidad, gran parte de esos residuos se acumulan de manera indefinida en los vertederos o se incineran, con la consiguiente emisión de CO₂ a la atmósfera. Una pequeña parte de los residuos está empezando a ser aprovechada como nutrientes en la industria cárnica (Pan, 2016; Van Heugten, 2002), con resultados variables.

En el entorno natural también podemos encontrar gran cantidad de aves, si bien no en la misma densidad poblacional que en las granjas avícolas. Sin embargo, pese a su abundancia, no encontramos restos de plumas a gran escala, de lo que podemos deducir que hay algún mecanismo por el cual se degradan en el medio natural. Por otra parte, en el plumaje de las aves podemos encontrar una gran variedad de microorganismos, principalmente bacterias y hongos. El metabolismo de los microorganismos es enormemente variado, siendo, en conjunto, capaces de degradar cualquier materia de origen natural y muchas de origen artificial, por ejemplo plásticos y derivados del petróleo (Urbanek, A.K, 2018). Es posible, por lo tanto, que sean los microorganismos asociados a las plumas los responsables de la degradación de las mismas, pese a la posible resistencia a dicha degradación que aportarían los propios pigmentos de las plumas.

La gran diversidad metabólica de los microorganismos es clave tanto para su supervivencia como para su patogenicidad (Day Jr. et al, 2000; Tondo et al, 2020). Sin embargo, tras realizar una búsqueda profunda, utilizando diversos motores (Google Scholar, SCOPUS, Web of Science), con varios términos clave (“melanine degradation”, “melanine”, “bacterial melanine degradation”, y similares), no se ha encontrado evidencia escrita y publicada de cómo la melanina es degradada por los distintos microorganismos, lo que parece apoyar las teorías que la proponen como molécula con funciones de protección frente a los microorganismos, debido principalmente a la dificultad que presentan éstos para degradarla. Existen algunos estudios clínicos que intentan discernir cómo se degrada la melanina en algunas patologías humanas (Kayatz et al, 2001; Dontsov et al, 2017), pero el mecanismo sigue siendo desconocido en su mayor parte.

En cuanto al metabolismo en las bacterias, se han encontrado patrones de variación en la actividad metabólica en función del pH del medio en el que se cultiven las bacterias (Davis, 1986). Esto puede deberse al menor rendimiento o inactivación de las enzimas necesarias para el metabolismo en las condiciones de pH probadas (Narendranath, 2005). Otra posibilidad es

que esta diferencia en las capacidades puede deberse a una inhibición en las regiones génicas que expresan (en parte o en su totalidad) las enzimas que participan en el metabolismo de las sustancias testadas (Wasfi et al, 2018).

En este estudio, nos planteamos varios objetivos:

- Comprobar la capacidad de degradación de plumas de pollo (*Gallus gallus*) que presentan 15 cepas bacterianas, aisladas del plumaje de estorninos negros (*Sturnus unicolor*), en función del color de pluma y del pH del medio.
- De forma análoga, comprobar la resistencia a la degradación de dichas plumas, en función de su color: las plumas negras presentan un mayor contenido en melanina que las blancas, por lo que, si la melanina tuviese función o efecto de protección, éstas se degradarían a una menor velocidad que las plumas blancas.
- Identificar microorganismos con capacidad de degradar y aprovechar la melanina como fuente de carbono, mediante la siembra en un medio sólido compuesto por tinta de calamar como única fuente de carbono.
- Identificar microorganismos útiles para la degradación de las plumas, como residuos de la industria avícola, así como discutir su posible utilidad futura en procesos de generación de nuevos materiales, como el bioplástico, a partir de materia orgánica de desecho y bacterias modificadas para la obtención de polihidroxibutirato (PHB).

Los aislados bacterianos provienen de la colección de cepas obtenida de plumas de estorninos en un estudio anterior, el cual evaluaba distintas características del plumaje en función de la humedad ambiental (Ramírez, 2022)

3. Materiales y métodos.

3.1 Degradación en medio líquido

Las cepas estudiadas fueron obtenidas de plumas de estornino negro, *Sturnus unicolor*, aisladas previamente en plumas en diferentes tratamientos de humedad, las cuales demostraron capacidades degradativas en un estudio previo (Ramírez, 2022, extracto en Tabla 1). En primera instancia, estas cepas se conservaban desde el momento de su aislamiento congeladas a -80°C en una disolución de glicerol al 20%.

Tabla 1: cepas estudiadas y tratamientos de las cuales se obtuvieron. Extraído de Ramírez, 2022

| Cepa | Spp | Tratamiento |
|------|---|-------------|
| 1 | <i>Bacillus zhangzhouensis</i> | Control |
| 2 | <i>Nocardiopsis alkaliphila</i> | Seco |
| 3 | <i>Nocardiopsis alkaliphila</i> | Seco |
| 4 | <i>Glutamicibacter protophormiae</i> | Húmedo |
| 5 | <i>Staphylococcus equorum</i> subsp. <i>linens</i> | Húmedo |
| 6 | <i>Staphylococcus saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i> | Control |
| 7 | <i>Glutamicibacter creatinolyticus</i> | Seco |
| 8 | <i>Mammaliococcus lentus</i> | Control |
| 9 | <i>Glutamicibacter creatinolyticus</i> | Control |
| 10 | <i>Glutamicibacter creatinolyticus</i> | Húmedo |
| 11 | <i>Mammaliococcus lentus</i> | Húmedo |
| 12 | <i>Bacillus cereus</i> | Húmedo |
| 13 | <i>Bacillus tequilensis</i> | Control |
| 14 | <i>Paenibacillus montaniterrae</i> | Húmedo |
| 15 | <i>Brachybacterium alimentarium</i> | Húmedo |

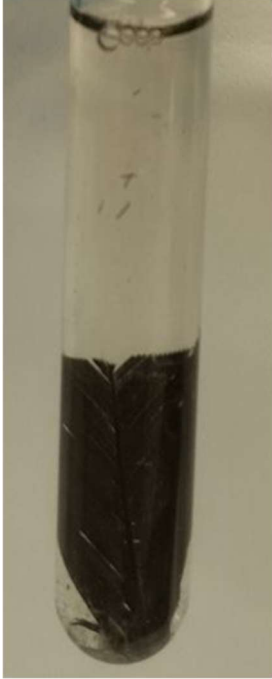
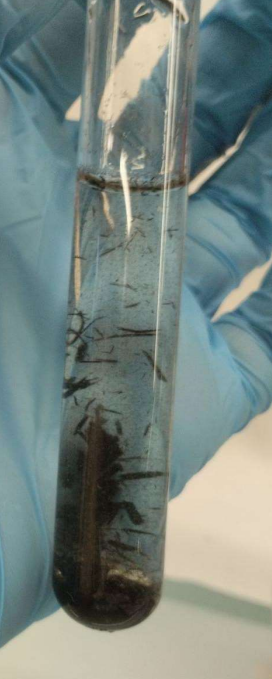


Como fase previa al estudio, se sembraron las cepas conservadas en criotubos con glicerol a -80°C en medio sólido en placa, con el objetivo de verificar que en las muestras congeladas no

existieran contaminaciones. Para el crecimiento, se utilizaron placas de Tripto-casein Soy Agar (TSA) y Luria-Bertani (LB) preparadas según instrucciones del fabricante (40g de medio/1L agua destilada). Las cepas se sembraron en campana de flujo laminar y fueron cultivadas en estufa a 28°C durante un mínimo de 48h, antes de evaluar su crecimiento. Para muchas de las cepas, fueron necesarias más de las 48h iniciales, llegando incluso a necesitar 10 días para mostrar crecimiento. En caso de detectar contaminaciones, las cepas se resembraban por agotamiento en estría hasta obtener cultivos puros, y posteriormente se congelaban en criotubos con glicerol al 20%, sustituyendo las muestras originales contaminadas.

Para evaluar el potencial queratinolítico y melaninolítico de las cepas, se seleccionaron 15 cepas que en un estudio anterior mostraron estas capacidades (Ramírez, 2022). Para cada cepa, se preparó una batería de medios PBS-extracto de levadura, según Williams, 1990, con la siguiente composición: NH₄Cl, 0,5 g/L; NaCl, 0,5 g/L; extracto de levadura, 0,1 g/L; MgCl₂· 6 H₂O, 0,1 g/L, K₂HPO₄ y KH₂PO₄, en concentraciones variables según el pH. Se prepararon medios a 3 niveles de pH distintos: 5,8, 7 y 8. Para el medio ácido (pH 5,8), se utilizaron 8,5 mL K₂HPO₄ 1M por litro de medio y 91,5 mL KH₂PO₄ 1 M por litro de medio. Para el medio neutro (pH 7), se utilizaron 61,5 mL K₂HPO₄ 1M por litro de medio y 38,5 mL KH₂PO₄ 1 M por litro de medio. Para el medio básico (pH 8), se utilizaron 94 mL K₂HPO₄ 1M por litro de medio y 6 mL KH₂PO₄ 1 M por litro de medio. Los medios fueron distribuidos en tubos de ensayo, aproximadamente 10 mL por tubo, y se esterizaron en autoclave a 120°C durante 20 minutos. Posteriormente, se introdujo en cada tubo un fragmento de pluma de gallina, previamente esterilizadas también en autoclave en las mismas condiciones. Para este experimento, las plumas se han cortado por ambos extremos, dejando únicamente la región central, y se han esterilizado posteriormente.

Para cada cepa, se inocularon una pluma de color blanco y otra de color negro, ambas de gallina doméstica (*Gallus gallus*), en cada uno de los 3 niveles de pH testados, con 300 microlitros de una suspensión de la cepa en PBS a pH 7, con una concentración similar a un estándar McFarland 5 (aproximadamente $1,5 \times 10^9$ células/mL), dándonos un total de 6 tubos por cepa. Como control, se dejaron sin inocular 2 sets completos (3 pH distintos x 2 colores de pluma). Se realizaron 2 réplicas del conjunto. Estos tubos se incubaron inclinados, en condiciones de agitación a 110 rpm, oscuridad y a temperatura ambiente, durante 40 días, realizándose una observación visual y una fotografía para observar el nivel de degradación de las plumas a las 0h, 48h, 7 días y desde los 7 días, cada 2-3 días (L, X y V) hasta completar el experimento.

Como forma de medida de la degradación de las plumas, se estableció una escala en función de la degradación que mostraban las plumas. En caso de no sufrir alteraciones visibles en la morfología, a las plumas se les asignaba un valor de degradación de 0. En caso de sufrirlas, se les asignaban valores del 1 (degradación mínima) al 5 (degradación completa). Ningún tratamiento ha alcanzado la degradación completa de la pluma. En la figura 1 se pueden observar fotografías de cada uno de los niveles de degradación alcanzados.

| | |
|---|--|
|  |  |
| <p>Nivel 1 de degradación: comienzan a aparecer fibras y pequeños posos oscuros en el medio. La pluma está estructuralmente intacta</p> | <p>Nivel 2 de degradación: fragmentos grandes, formados por varias bárbulas, se desprenden del raquis. Podemos ver fragmentos grandes de pluma</p> |
|  |  |
| <p>Nivel 3 de degradación: los fragmentos grandes de bárbulas se deshacen en fragmentos más pequeños y se posan en el fondo. Aún quedan bárbulas unidas al raquis. En plumas negras, el medio empieza a adquirir un tono más oscuro</p> | <p>Nivel 4 de degradación: casi todas las bárbulas se han separado del raquis y forman pequeños aglomerados suspendidos en el medio o en el fondo.</p> |
| <p>Figura 1: escala de niveles de degradación.</p> | |

3.2 Crecimiento con melanina como única fuente de carbono

Se estudió la capacidad melaninolítica de las cepas, realizando la siembra de las cepas en medio sólido de tinta de calamar como única fuente de carbono. Su composición es, principalmente, melanina (Derby, 2014; Soto-Gómez, 2016). Se incubó a 28°C realizando la primera lectura a las 48h, y posteriormente se hicieron medidas cada semana hasta los 20 días, para observar el crecimiento bacteriano.

3.3 Análisis estadístico.

Para el análisis de los datos, estos se han recogido en una tabla de Excel y después han sido tratados con Rstudio. Se ha realizado un GLM a cada una de las variables (color, pH y cepa) para, posteriormente, estudiar su relación con la degradación final mediante un ANOVA.

4. Resultados.

4.1 Degradación en medio líquido

En general, podemos observar que todas las cepas necesitan 10 días o más para que la pluma empiece a mostrar signos de degradación, siendo las cepas 2 (*Nocardiopsis alkaliphila* L6333) y 3 (*Nocardiopsis alkaliphila* L6334) las primeras en mostrarlos (10 días). Tras 40 días, estas dos cepas son las que mayor capacidad degradativa demostraron, llegando a descomponer todas las bárbulas de la pluma, dejando únicamente el raquis; en la figura 1 pueden encontrarse imágenes de los distintos grados de degradación. Otras cepas también mostraron capacidad de degradación, pero ninguna alcanzó resultados similares. Podemos observar que, en los medios con plumas negras degradadas, el tono del medio vira ligeramente hacia un color más oscuro, parduzco, posiblemente por la melanina, algunos compuestos degradados o fragmentos pequeños de pluma en suspensión.

4.1.1 Análisis estadístico del efecto de la presencia de melanina en la degradación

En general, las plumas blancas comenzaron a degradarse antes que las negras. Sin embargo, no en todos los casos se degradaron en mayor medida: al final del experimento, ambos colores mostraban una degradación similar entre sí (Figura 2). Tras realizar un ANOVA para estudiar la correlación entre la degradación y el color, se ha visto que ésta no es significativa.

4.1.2 Efecto del pH

En cuanto al crecimiento en función del pH, la variación es específica de cada bacteria, no se pueden establecer generalidades salvo que aquellas bacterias sembradas en medios fuera de su rango óptimo de pH mostraron menor crecimiento que aquellas sembradas en medios menos hostiles. En algunos casos, las cepas fueron incapaces de prosperar y degradar la pluma.

En cuanto a la degradación en función del pH, la variabilidad dentro de cada cepa resultó más llamativa de lo esperado. Ciertas cepas que no mostraban diferencias aparentes en el crecimiento entre medios, mostraban distinta capacidad de degradación de las plumas. En ocasiones, el pH fue más influyente que el color de la pluma para la degradación de las mismas, en concreto en las cepas 1 (*Bacillus zhangzhouensis*), 2 (*Nocardiopsis alkaliphila*), 3 (*N. alkaliphila*), 4 (*Glutamicibacter protophormiae*), 10 (*G. creatinolyticus*) y 15 (*Brachybacterium alimentarium*) En el resto de cepas, la degradación era similar en los 3 niveles de pH.

Tras realizar un ANOVA para estudiar la correlación entre la degradación y el pH, se ha visto que ésta es significativa (pvalor < 0,05)

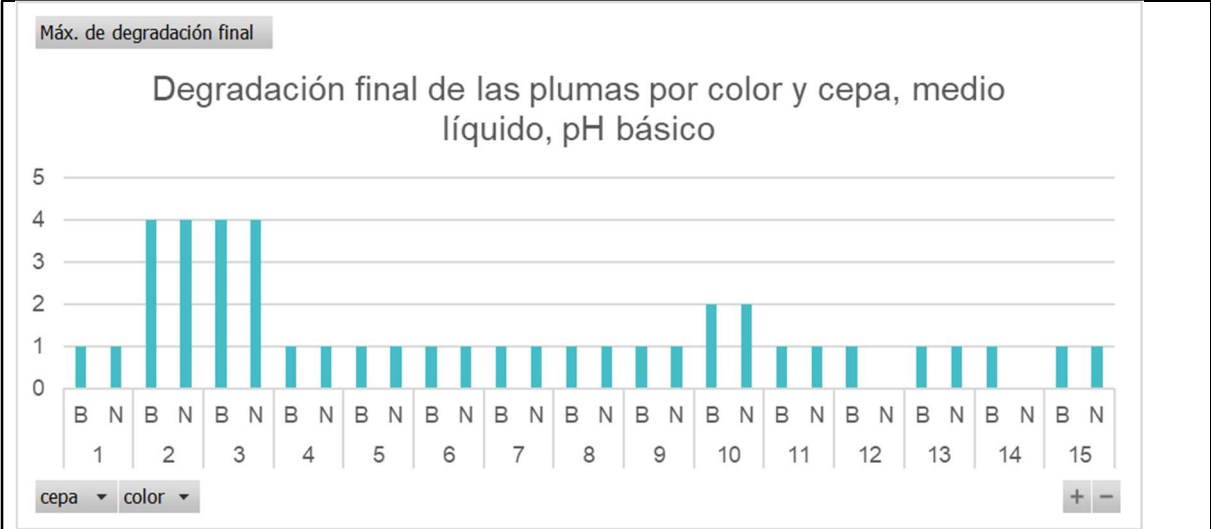
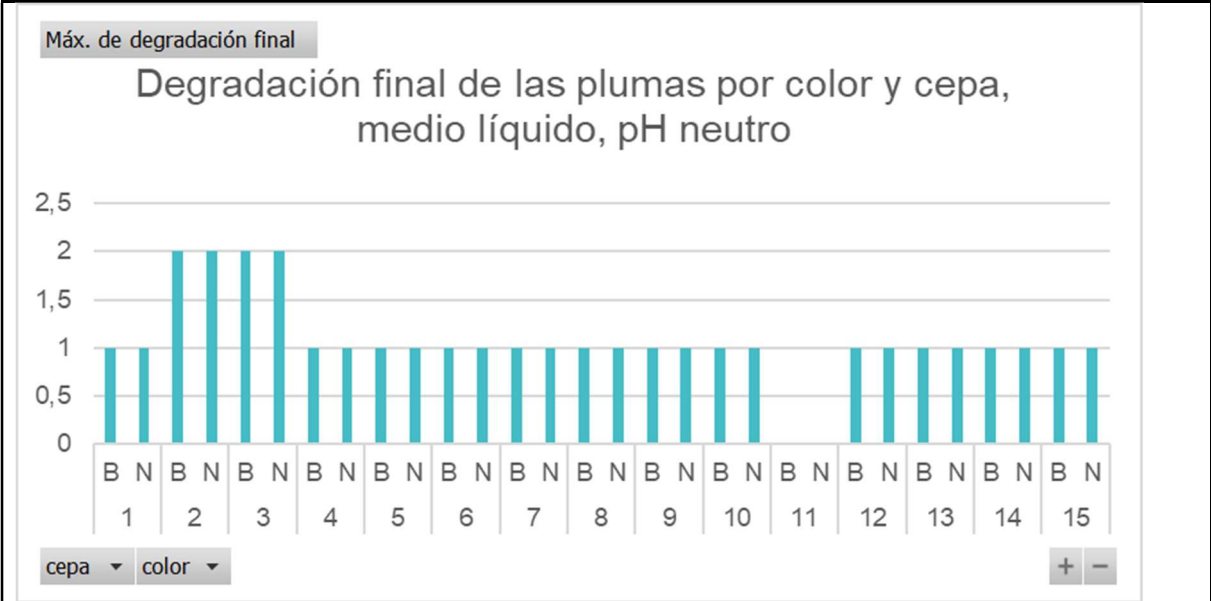
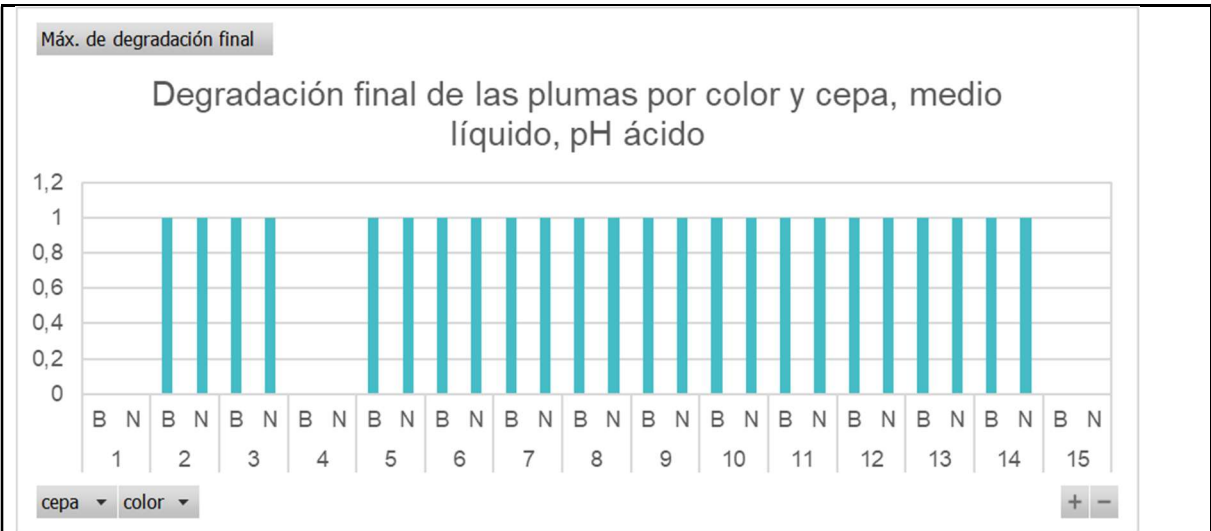


Figura 2: Degradación promedio (medida entre 0 y 4) en función del pH, del color de la pluma (primera fila de la leyenda: B= blanco, N= negro) y de la cepa (segunda fila de la leyenda, 1 a 15) . Los medios ácidos y neutros han sufrido una degradación similar en ambos colores, sin embargo, la degradación promedio de las plumas blancas, en medio básico, es ligeramente superior a la de las plumas negras en el mismo medio. Es en el medio básico donde se alcanzan mayores niveles de degradación.

4.1.3 Pruebas fenotípicas

De las 15 cepas estudiadas, las dos cuya secuencia del gen ribosómico del 16S mostraba alta similitud con *N. alkaliphila* fueron las únicas en las que se detectó la formación de biofilm sobre la superficie de las plumas. Por otra parte, todas las bacterias estudiadas son catalasa positivas, y algunas también muestran actividad oxidasa (Tabla 2, extracto de Ramírez, 2022)

| Cepa | Identificador | Spp | Tratamiento | Catalasa | Oxidasa |
|------|---------------|---|-------------|----------|---------|
| 1 | L6231 | <i>Bacillus zhangzhouensis</i> | Control | + | - |
| 2 | L6333 | <i>Nocardiopsis alkaliphila</i> | Seco | + | + |
| 3 | L6334 | <i>Nocardiopsis alkaliphila</i> | Seco | + | + |
| 4 | L6802 | <i>Glutamicibacter protophormiae</i> | Húmedo | + | - |
| 5 | L6803 | <i>Staphylococcus equorum</i> subsp. <i>linens</i> | Húmedo | + | - |
| 6 | L6861 | <i>Staphylococcus saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i> | Control | + | - |
| 7 | L7022 | <i>Glutamicibacter creatinolyticus</i> | Seco | + | - |
| 8 | L7162 | <i>Mammaliococcus lentus</i> | Control | + | + |
| 9 | L7321 | <i>Glutamicibacter creatinolyticus</i> | Control | + | - |
| 10 | L7581 | <i>Glutamicibacter creatinolyticus</i> | Húmedo | + | - |
| 11 | L7582 | <i>Mammaliococcus lentus</i> | Húmedo | + | + |
| 12 | T6001 | <i>Bacillus cereus</i> | Húmedo | + | + |
| 13 | T7481 | <i>Bacillus tequilensis</i> | Control | + | + |
| 14 | T7663 | <i>Paenibacillus montaniterrae</i> | Húmedo | + | - |
| 15 | T7582 | <i>Brachybacterium alimentarium</i> | Húmedo | + | + |

4.2. Crecimiento con melanina como única fuente de carbono

El crecimiento en medio sólido ha sido notablemente inferior que en medio líquido, y más lento. El crecimiento se observa con la aparición de una colonia sobre la placa, en el lugar de la inoculación (figura 2). Todas las cepas presentaban crecimiento a los 20 días.

Encontramos diferencias notables tanto en la cantidad de crecimiento como en la morfología de las colonias. Con respecto al crecimiento, podemos observar que las cepas L7162 (*Mammaliococcus lentus*), L7321 (*Glutamicibacter creatinolyticus*), T7481 (*Bacillus tequilensis*), T6001 (*Bacillus cereus*), y L6231 (*Bacillus zhangzhouensis*) han crecido en abundancia (por lo que podemos intuir que han tenido un mejor aprovechamiento de la melanina); las cepas T7582 (*Brachybacterium alimentarium*), L7581 (*Glutamicibacter creatinolyticus*), L6861 (*Staphylococcus saprophyticus* subsp. *saprophyticus*), L6803 (*Staphylococcus equorum* subsp. *linens*), L6333 (*Nocardiopsis alkaliphila*) y L7022 (*Glutamicibacter creatinolyticus*) han tenido un

crecimiento más reducido, y las cepas L7582 (*Mammaliicoccus lentus*), L6802 (*Glutamicibacter protophormiae*), L6334 (*Nocardiosis alkaliphila*) y T7663 (*Paenibacillus montaniterrae*) han mostrado un crecimiento pobre, siendo el de la cepa L6334 prácticamente inapreciable.

| | |
|--|---|
|  |  |
| <p>Nivel 1: se observa crecimiento en algunos puntos de la gota de inoculación</p> | <p>Nivel 2: crecimiento uniforme en la gota de inoculación</p> |
|  |  |
| <p>Nivel 3: crecimiento denso en la gota de inoculación</p> | <p>Nivel 4: crecimiento más allá de la gota de inoculación</p> |
| <p>Figura 3: escala de niveles de crecimiento</p> | |

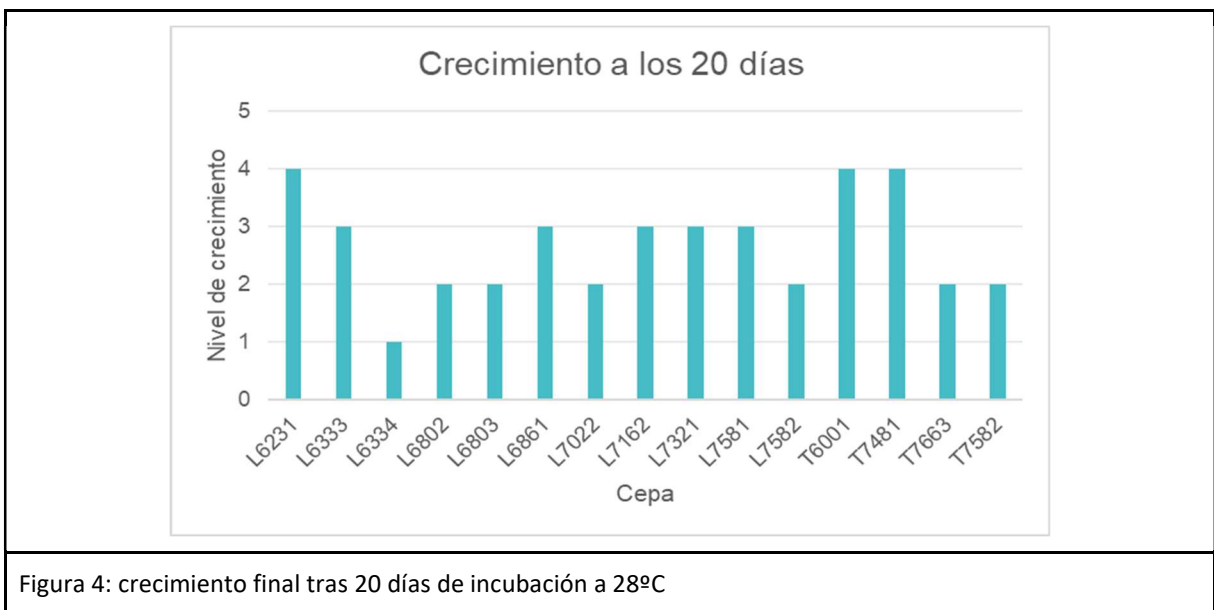


Figura 4: crecimiento final tras 20 días de incubación a 28°C

En cuanto a la morfología, podemos observar que las cepas T7481 (*Bacillus tequilensis*), T6001 (*Bacillus cereus*) y L6231 (*Bacillus zhangzhouensis*) tienen una morfología irregular, con la superficie rugosa y el borde lobulado. Las cepas T7663 (*Paenibacillus montaniterrae*), L7581 (*Glutamicibacter creatinolyticus*), L7582 (*Mammaliococcus lentus*), L7022 (*Glutamicibacter creatinolyticus*), L6333 (*Nocardiopsis alkaliphila*) y L6334 (*Nocardiopsis alkaliphila*) presentan cierta forma circular, con zonas puntiformes con algo más de crecimiento. Las cepas T7582 (*Mammaliococcus lentus*), L6861 (*Staphylococcus saprophyticus* subsp. *saprophyticus*), L6803 (*Staphylococcus equorum* subsp. *linens*) y L6802 (*Glutamicibacter protophormiae*) parecen tener una morfología homogénea, con los bordes lisos y regulares. La cepa L7321 (*Glutamicibacter creatinolyticus*) presenta una morfología irregular, con bordes rectos.

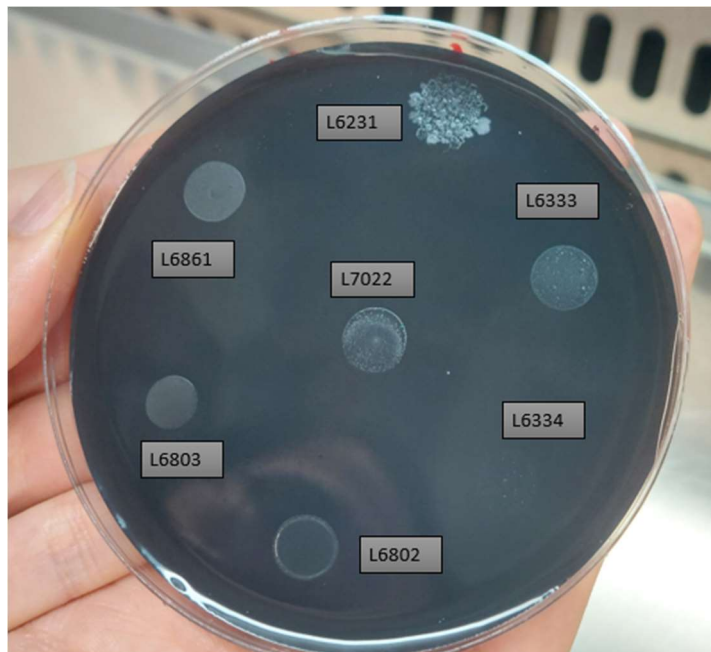
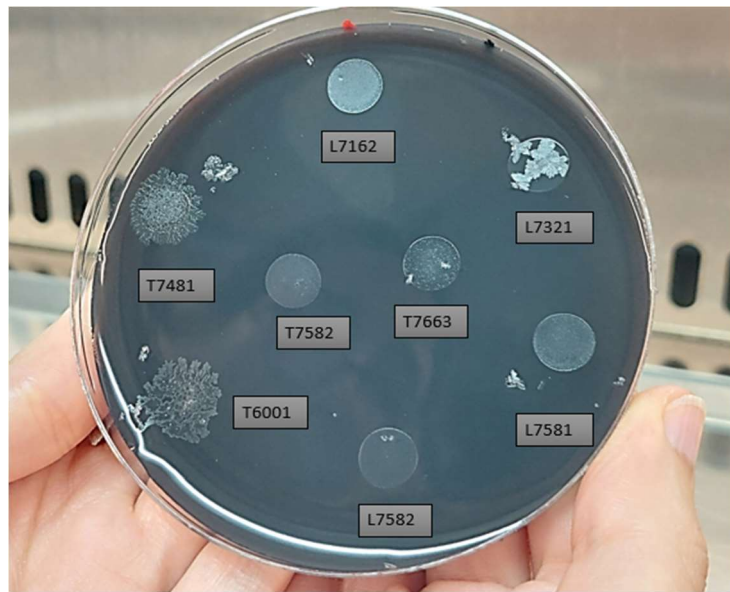


Figura 5: morfología de las cepas en medio sólido de tinta de calamar.

5. Discusión y conclusiones

5.1 Efectos del color

Si bien tradicionalmente se le ha asignado a la melanina una funcionalidad como pigmento protector frente a la degradación, nuestros resultados no permiten confirmar ni rebatir este dato, ya que en algunas cepas las plumas empezaron a degradarse de manera similar independientemente del color, mientras que en otras las plumas blancas comenzaron a degradarse antes que las negras. Esto no concuerda con los resultados que se han obtenido en otros estudios (Ramírez, 2022; Goldstein et al, 2004; Burt et al, 2004; Gunderson et al, 2008). Es posible que esto se deba a que en otros estudios utilizaban plumas enteras, mientras que en éste se han utilizado plumas previamente cortadas, lo que podría facilitar la degradación por parte de las bacterias, ya que disponen de una mayor superficie sobre la que actuar, al separarse las bárbulas del raquis y quedar la queratina expuesta. También es posible que sea consecuencia de los posibles cambios debidos al proceso de esterilización mediante autoclave, ya que este proceso podría modificar de alguna manera la estructura química de la melanina y/o la queratina, haciéndolas más bioaccesibles para las bacterias. (Gunderson et al, 2008.) Es importante mencionar que todos los estudios, incluyendo éste, han utilizado cepas aisladas para probar la degradación de las plumas; en concreto, los estudios de Goldstein et al, 2004; Burt et al, 2004; y Gunderson et al, 2008, únicamente realizan sus pruebas con aislados de *Bacillus licheniformis*. Esto difiere mucho del medio natural, donde los organismos se encuentran formando un microbioma complejo. Por ello, no se pueden identificar las posibles sinergias y antagonismos que suceden en un entorno salvaje.

5.2 Efectos del pH

Es conocido que la variación en el pH del medio afecta a la actividad microbiológica (Olson, 1993). Los resultados muestran que llega a influir más que el color (y, por lo tanto, la presencia de pigmentos) de la pluma. Es posible que sea necesario un pH concreto para la activación o inactivación de las rutas de degradación de la melanina y/o queratina, bien por inactivación de alguna de las enzimas excretadas relacionadas con su metabolismo (Goldstein, 2004), bien por la inactivación de la expresión génica que regula el metabolismo (Narendranath, 2005). También es posible que el propio pH pueda llegar a alterar la estructura de la queratina, haciéndola más bioaccesible (Ito et al, 1998).

5.3 Pruebas fenotípicas

En cuanto a las pruebas fenotípicas, todos los organismos presentaban actividad catalasa positiva, y en las cepas 2 (*Nocardiosis alkaliphila*), 3 (*Nocardiosis alkaliphila*), 8 (*Mammaliococcus lentus*), 11 (*Mammaliococcus lentus*), 12 (*Bacillus cereus*), 13 (*Bacillus tequilensis*) y 15 (*Brachybacterium alimentarium*), la actividad oxidasa también fue positiva (Ramírez, 2022). Además, las cepas similares a *N. alkaliphila* (cepas 2 y 3) fueron capaces de generar biofilm sobre la superficie de la pluma.

Es posible que la capacidad de generar biofilm esté relacionada con la mayor degradación que han sufrido las plumas de estos tratamientos, ya que permite una mayor retención, y por tanto mayor tiempo de actividad, de las enzimas digestivas vertidas sobre la pluma por las bacterias. Este efecto degradativo se ha observado tanto en tetraciclinas (Xiao, 2023) como en varios tipos de polímeros plásticos (Omarova, 2019; Balasubramanian, 2010), por lo que es posible que también influya sobre el proceso degradativo de la pluma.

5.4 Melanina como única fuente de carbono

En el medio de tinta de calamar, el crecimiento de las cepas se ha visto más limitado que en el medio líquido, posiblemente por la ausencia de otras fuentes de carbono (principalmente queratina) que sí están presentes en las plumas (Goldstein, 2004). Sin embargo, tras 20 días de incubación, algunas características macroscópicas de las colonias que podían observarse en medios de crecimiento general (LB, TSA) estaban ausentes; notablemente, la esporulación de las cepas 2 y 3, similares a *N. alkaliphila*. Pese a ello, todas las cepas han mostrado crecimiento, con lo que podemos afirmar que son capaces de utilizar la melanina como única fuente de carbono. Esta capacidad degradativa no está dilucidada al completo, como indica la falta de bibliografía acerca del tema. Por otra parte, prácticamente toda la bibliografía atribuye a la melanina la capacidad para aportar a la pluma mayor resistencia física, contra la abrasión, y química, frente a la degradación bacteriana. Podría resultar que, al no conocer por completo los procesos implicados en su degradación, se le haya inferido a la melanina una mayor capacidad protectora de la que realmente tiene.

Es posible inferir que aquellas cepas con una mayor tasa de aprovechamiento de la melanina habrán tenido un mayor crecimiento; por lo tanto, podemos decir que entre las cepas que hemos estudiado, las cepas las cepas L7162 (*Mammaliococcus lentus*), L7321 (*Glutamicibacter creatinolyticus*), T7481 (*Bacillus tequilensis*), T6001 (*Bacillus cereus*), y L6231 (*Bacillus zhangzhouensis*) podrían tener mayor capacidad para utilizar la melanina como fuente de carbono. Sin embargo, hay que tener en cuenta el lento crecimiento de algunos de los organismos (p.ej *N. alkaliphila*), por lo que no hay que descartar que aquellos que hayan demostrado poco crecimiento también puedan aprovechar la melanina; aunque quizás lo hagan más lentamente o de forma más ineficiente.

En referencia a la morfología de las cepas, la mayor discrepancia de resultados la tenemos entre las cepa L6333 y L6334, ambas identificadas como similares a *N. alkaliphila*, y con crecimientos muy dispares: la cepa L6333 ha crecido notablemente más que la L6334, la cual se ve apenas sobre la placa. Esto puede deberse a un error durante la inoculación de la placa, ya que estas bacterias son incrustantes en el agar y crecen formando colonias muy difíciles de disgregar. Por lo tanto, es posible que en la muestra de la cepa L6333 hubiese una mayor carga bacteriana de la correspondiente, o que en la L6334 fuese menor de lo debido.

5.5 Posible relación con la regla de Gloger

La regla de Gloger enuncia que aumenta el melanismo en latitudes tropicales, ligado a un aumento en la humedad y la temperatura. En su artículo de 2004, Burt et al proponen una posible relación entre esta regla y la presencia de microorganismos degradadores del plumaje: la degradación bacteriana aumentaría en lugares húmedos, por lo que aumentaría a su vez la presión evolutiva para mantener el plumaje en buen estado, dando como resultado un aumento del melanismo en un patrón muy similar al descrito en la regla de Gloger. Esta proposición concuerda con los resultados mostrados en los artículos de Goldstein et al, 2004, y Gunderson et al, 2008. Sin embargo, no concuerda con los resultados obtenidos en este estudio por dos motivos: el primero, la velocidad e intensidad de degradación de las plumas es similar independientemente del color, y el segundo, la cepa que ha mostrado mayor poder degradativo con diferencia, la correspondiente con *Nocardiopsis alkaliphila*, proviene de una muestra tomada de un ave en un tratamiento seco. Es posible que la discrepancia en resultados provenga del tratamiento de las plumas (en los estudios anteriormente mencionados se utilizaban plumas enteras, mientras que en éste se ha utilizado la región central de la pluma únicamente), por el uso del autoclave como forma de esterilización, o simplemente al haber utilizado distintos microorganismos (los estudios anteriormente mencionados trabajaban exclusivamente con cepas identificadas como *Bacillus licheniformis*).

5.6 Conclusiones y futuras líneas

Sería interesante, en un futuro, estudiar las cepas con mayor potencial degradativo, con el fin de poder acotar la región genética que controle la ruta metabólica; una vez aislado, si fuese posible transformar otras bacterias interesantes (p.ej. productoras de bioplásticos o biocombustibles), se podrían utilizar las plumas de pollo como fuente de carbono en los medios de cultivo de estas bacterias, lo que reduciría el volumen de las mismas en vertederos al mismo tiempo que impulsaría el desarrollo y uso de estos nuevos materiales, menos contaminantes que sus equivalentes tradicionales.

Al mismo tiempo, sería muy útil poder repetir estos experimentos con comunidades bacterianas en lugar de cepas aisladas, de cara a poder observar sinergias y/o antagonismos que puedan producirse. Es posible que esta experimentación con comunidades permita también discernir si la presión por mantenimiento del plumaje influye sobre la regla de Gloger o la explica en parte. También sería necesario realizar estudios acerca de si la eumelanina y la pheomelanina tienen similar o diferente resistencia a la degradación bacteriana, lo que también podría ayudar a esclarecer si existe o no esta relación entre microbioma y regla de Gloger.

Se han hecho experimentos sustituyendo parte del pienso de animales por plumas molidas, sin mucho éxito (Van Heugten, 2002). Sin embargo, si estas plumas fuesen digeridas por bacterias, se podría obtener proteína de origen bacteriano para piensos (Pan, 2016). Esto podría reducir la presión global que ejerce la ganadería intensiva sobre las tierras de cultivo, permitiendo un mejor aprovechamiento de las mismas al mismo tiempo que se reduce el espacio ocupado de los vertederos y se minimiza la producción de gases de efecto invernadero derivada de la

acumulación de materia orgánica en los mismos, reduciendo en un porcentaje variable (pero consistente) las emisiones de las empresas que sean adjudicatarios de la gestión de los vertederos. Todas estas aplicaciones, por separado o en conjunto, podrían ayudar a la consecución de algunas de las metas fijadas por los ODS, en concreto los ODS 2, hambre cero, ya que podrían ayudar a asegurar, o al menos mejorar, la sostenibilidad de los sistemas de producción avícola, así como mejorar la calidad de los piensos utilizados en ganadería; y 12, producción y consumo responsables, ya que podrían ayudar a gestionar de manera ecológica los residuos de la producción de productos avícolas, lo que a su vez sería de apoyo para lograr un uso eficiente de nuestros recursos naturales.

6. Bibliografía.

Balasubramanian, V., et al. "High-density polyethylene (HDPE)-degrading potential bacteria from marine ecosystem of Gulf of Mannar, India." *Letters in applied microbiology* 51.2 (2010): 205-211.

Burt Jr, Edward H., and Jann M. Ichida. "Gloger's rule, feather-degrading bacteria, and color variation among song sparrows." *The Condor* 106.3 (2004): 681-686.

Burt Jr, Edward H., and Jann M. Ichida. "Occurrence of feather-degrading bacilli in the plumage of birds." *The Auk* 116.2 (1999): 364-372.

Davis, C. R., et al. "Growth and metabolism of lactic acid bacteria during and after malolactic fermentation of wines at different pH." *Applied and environmental microbiology* 51.3 (1986): 539-545.

Day Jr, William A., et al. "Role of catalase in *Campylobacter jejuni* intracellular survival." *Infection and immunity* 68.11 (2000): 6337-6345.

Dontsov, A. E., N. L. Sakina, and M. A. Ostrovsky. "Loss of melanin by eye retinal pigment epithelium cells is associated with its oxidative destruction in melanolipofuscin granules." *Biochemistry (Moscow)* 82 (2017): 916-924.

Goldstein, Gerald, et al. "Bacterial degradation of black and white feathers." *The Auk* 121.3 (2004): 656-659.

Gunderson, Alex R., et al. "Resistance of melanized feathers to bacterial degradation: is it really so black and white?." *Journal of Avian Biology* 39.5 (2008): 539-545.

Ito, Shosuke, and Kazumasa, Wakamatsu. "Chemical degradation of melanins: application to identification of dopamine-melanin." *Pigment Cell Research* 11.2 (1998): 120-126.

Kayatz, Peter, et al. "Oxidation causes melanin fluorescence." *Investigative ophthalmology & visual science* 42.1 (2001): 241-246.

Narendranath, Neelakantam V., and Ronan Power. "Relationship between pH and medium dissolved solids in terms of growth and metabolism of lactobacilli and *Saccharomyces cerevisiae* during ethanol production." *Applied and environmental microbiology* 71.5 (2005): 2239-2243.

Olson, E.R. "Influence of pH on bacterial gene expression." *Molecular Microbiology* 8 (1993): 5-14.

Omarova, Marzhana, et al. "Biofilm formation by hydrocarbon-degrading marine bacteria and its effects on oil dispersion." *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* 7.17 (2019): 14490-14499.

Pan, L., et al. "Enzymatic feather meal as an alternative animal protein source in diets for nursery pigs." *Animal Feed Science and Technology* 212 (2016): 112-121.

Pough, F. Harvey, Christine Marie Janis, and John B. Heiser. *Vertebrate life*. Vol. 733. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall, 1999.

R Core Team (2023). *_R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <<https://www.R-project.org/>>.

Ramírez, D. "Aislamiento y caracterización del potencial degradativo de bacterias aisladas de *Sturnus unicolor*". Trabajo de Fin de Grado, Universidad Rey Juan Carlos, 2022

RStudio Team (2020). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>.

Tondo, María Laura, et al. "KatE from the bacterial plant pathogen *Ralstonia solanacearum* is a monofunctional catalase controlled by HrpG that plays a major role in bacterial survival to hydrogen peroxide." *Frontiers in plant science* 11 (2020): 1156.

Urbanek, Aneta K., Waldemar Rymowicz, and Aleksandra M. Mirończuk. "Degradation of plastics and plastic-degrading bacteria in cold marine habitats." *Applied microbiology and biotechnology* 102 (2018): 7669-7678.

Van Heugten, E., and T. A. T. G. Van Kempen. "Growth performance, carcass characteristics, nutrient digestibility and fecal odorous compounds in growing-finishing pigs fed diets containing hydrolyzed feather meal." *Journal of Animal Science* 80.1 (2002): 171-178.

Wasfi, R., Abd El-Rahman, O.A., Zafer, M.M. and Ashour, H.M. (2018), Probiotic *Lactobacillus* sp. inhibit growth, biofilm formation and gene expression of caries-inducing *Streptococcus mutans*. *J. Cell. Mol. Med.*, 22: 1972-1

Xiao, Chuanbao, et al. "Photocatalytic synergistic biofilms enhance tetracycline degradation and conversion." *Environmental Science and Ecotechnology* 14 (2023): 100234.