

# AISLAMIENTO DE UNA CEPA DE *Kocuria rosea* DEGRADADORA DE PLUMAS DE AVES DE CORRAL

## Isolation of a Poultry Feather-degrading *Kocuria rosea* Strain

Nereida Coello<sup>1</sup>, Luis Vidal<sup>1</sup> y Antonio Bretaña<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Procesos Biotecnológicos, Instituto de Biología Experimental, Universidad Central de Venezuela, Apartado 47279. Caracas 1041A, Venezuela.

<sup>2</sup>Unidad de Microscopía Electrónica, Centro de Estudios Biomédicos y Veterinarios. IDECYT, Universidad Nacional Experimental Simón Rodríguez. Caracas, Venezuela

### RESUMEN

Con el objeto de buscar un método biológico para el procesamiento de las plumas, se aisló un coco Gram positivo a partir de un depósito colector de una planta beneficiadora de aves, empleando un medio selectivo preparado con polvo de plumas como principal fuente de carbono, energía y nitrógeno. El microorganismo aislado, identificado como *Kocuria rosea*, fue capaz de degradar plumas enteras en medio de cultivo salino pH 7,5 a 40°C en 72 horas. Se pudo observar que el incremento en el tiempo de esterilización por calor húmedo del medio de cultivo favorece la acción del microorganismo sobre las plumas. La mayor degradación de las plumas se obtuvo en cultivos de *Kocuria rosea* incubados entre 35 – 40°C. La microscopía electrónica de las células en cultivo reveló la presencia de planos de división asimétricos y gránulos de reserva de tipo glucógeno y polifosfatos. Estudios posteriores permitirán establecer el potencial biotecnológico de la fermentación de plumas por la cepa *Kocuria rosea* para la producción de metabolitos microbianos de alto valor agregado.

**Palabras clave:** *Kocuria*, plumas, biodegradación, ultraestructura.

### ABSTRACT

In order to look for a biological method for feathers processing, a Gram positive coccus was isolated from a waste collector of a poultry processing plant using a selective media prepared with feather powder as the main source of carbon and energy. The isolated microorganism identified as *Kocuria rosea*, was able to degrade whole feathers in submerged cultures pH 7,5 at 40°C in 72 hours. It was demonstrated that the increment in the time of autoclaving of the culture media enhances the ac-

tion of the microorganism on feathers. The biggest degradation of feathers was obtained in cultures of *Kocuria rosea* incubated between 35 and 40°C. The electronic microscopy of cells in cultivation revealed the presence of asymmetric division planes and granules of glycogen and polyphosphate. Later studies will allow to establish the biotechnological potential of feather fermentation by *Kocuria rosea* for the production of microbial metabolites of high added value.

**Key words:** *Kocuria*, feathers, biodegradation, ultrastructure.

### INTRODUCCIÓN

El aumento sostenido en el procesamiento de las aves de corral a nivel industrial ha planteado el problema de la ubicación de los desechos producto de su beneficio, en resguardo de la calidad del medio ambiente. En Venezuela existen 54 plantas beneficiadoras de aves de corral las cuales, en el año 1995 generaron como subproducto aproximadamente 30.000 TM de plumas [10]. En la búsqueda de una solución a este problema, la industria avícola ha realizado esfuerzos para utilizar dichos subproductos (plumas, vísceras, patas y cabezas) en la obtención de insumos de mayor valor agregado.

Por muchos años, las plumas han sido de interés en estudios nutricionales, dado que el 95% de su peso seco es proteína, de la que un 88% es queratina [8]. La queratina, presente también en pelos, uñas y cuernos, es una proteína fibrosa insoluble que en su estado nativo es muy resistente al tratamiento con enzimas proteolíticas, tales como tripsina, pepsina y papaína. Ello se debe al alto grado de enlaces disulfuro de la cisteína, enlaces de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas dentro de la molécula de queratina, que la hacen poco digestible cuando se suministra como fuente proteica en la dieta de animales [19].

A nivel industrial, gran parte de las plumas generadas en las plantas beneficiadoras de aves son recolectadas y sometidas a un proceso de cocción por vapor a alta presión y temperatura, obteniéndose un hidrolizado proteico en forma de harina, el cual es incorporado en alimentos concentrados para animales como suplemento proteico. Este procesamiento resulta de la modificación de la estructura proteica de las plumas, haciéndolas más susceptibles al ataque proteolítico de las enzimas digestivas, mejorando así su digestibilidad y en consecuencia, su utilización como suplemento nutricional. La harina de plumas ha sido evaluada extensivamente como alimento para aves y se ha encontrado que, además de ser poco digestible, presenta un desbalance de algunos aminoácidos esenciales, tales como histidina, metionina y triptofano, debido a la naturaleza propia de la proteína queratinosa y a la destrucción parcial de algunos aminoácidos termolábiles durante el procesamiento [2, 3, 5, 18]. De allí el uso limitado de la harina de plumas en la elaboración de alimentos concentrados y la búsqueda de nuevas estrategias para el tratamiento de las plumas que, siendo más rentables, resulten en un producto de mayor calidad nutricional.

En este sentido, una posibilidad es el uso de métodos biológicos para el aprovechamiento de las plumas como sustrato fermentable de microorganismos capaces de degradarlas. La literatura reporta el aislamiento de una cepa termófila de *Bacillus licheniformis* degradadora de plumas, obtenida de un digestor anaeróbico de desechos avícolas, la cual fue empleada para producir un hidrolizado de plumas [16, 17]. De manera similar, se ha aislado una cepa de *Streptomyces fradie* con capacidad queratinolítica e hiperproductora de metionina, con el objetivo de mejorar la calidad aminoacídica del hidrolizado producido [7].

De allí que, los procesos biotecnológicos representan para la industria avícola una forma alternativa de aprovechamiento de las plumas, al poder ser incluidas como fuente de nutrientes (C, N) en la formulación de medios de interés industrial para la producción de insumos de mayor valor económico, tales como proteasas tipo queratinasas y proteína unicelular de origen bacteriano. Una posibilidad es la utilización conjunta de la biomasa y del hidrolizado de plumas obtenido finalizada la fermentación en la nutrición animal, pudiendo representar hasta un 7% de enriquecimiento proteico [15] y a nivel cualitativo, un cambio en el perfil aminoacídico del producto obtenido debido al aporte de los aminoácidos propios de la biomasa [17]. El objetivo del presente trabajo fue el aislamiento, identificación y estudio de una cepa de *Kocuria rosea* capaz de utilizar plumas como sustrato fermentable.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para la preparación de los medios de cultivo fueron utilizadas plumas blancas de pollo, lavadas con abundante agua, esterilizadas por autoclave (15 min), secadas en estufa a 60°C

y almacenadas a temperatura ambiente hasta su utilización. La harina de plumas comercial, fue gentilmente donada por Planta Proagro de Protinal, Bejuma, Edo. Carabobo, Venezuela y obtenida mediante un proceso fisicoquímico de cocción por vapor a alta presión (90 lb) y temperatura (100°C) por 15 min en presencia de cal como acelerador de la hidrólisis. Las sales para la preparación de los medios fueron de Sigma Chemicals (USA) y el extracto de levadura y el agar, de Difco Laboratories (USA).

### Preparación de polvo de plumas

El polvo de plumas fue obtenido a partir de plumas enteras a las cuales se les descartó con tijeras el raquis, quedando sólo las barbas. Luego fueron lavadas con agua destilada, secadas a 60°C y molidas por abrasión empleando un homogenizador de vidrio. El homogenizado obtenido fue centrifugado (2.000 g, 15 min) y el sedimento resultante fue lavado con agua destilada por centrifugación bajo las condiciones descritas y secado a temperatura ambiente por 24 horas. El residuo seco resultante fue molido manualmente con un mortero y conservado en nevera a 4°C hasta su empleo posterior.

### Medios de cultivo

Los medios de cultivo contenían plumas (cuya presencia en la solución dependía del tipo de medio) y una solución de sales, ajustada su pH a 7,5 con KOH al 10%, preparada con:

NH <sub>4</sub> Cl	0,5 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,4 g
NaCl	0,5 g	MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,1 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,3 g	Extracto de levadura	0,1 g
		Agua destilada	1.000 mL

- Para el aislamiento del microorganismo se utilizó la solución salina basal suplementada con polvo de plumas (20 g/L) y agar (20 g/L).
- El cultivo del microorganismo se realizó en tubos de ensayo que contenían una pluma entera y 5 mL de la solución salina descrita anteriormente.
- La conservación de la cepa se realizó a 4°C en estrías de medio sólido. En este caso la solución salina fue suplementada con harina de plumas comercial (20 g/L) y agar (20 g/L).

Todos los medios de cultivo fueron esterilizados por autoclave (121°C, 15 min).

### Aislamiento del microorganismo degradador de plumas

La selección del microorganismo se llevó a cabo en base a su capacidad degradadora de plumas en medios de cultivo que contenían éstas como principal fuente de carbono y nitrógeno. Para ello, se tomaron muestras bacteriológicas de un depósito colector de desechos avícolas de una planta beneficiadora de aves ubicada en la ciudad de Caracas, D.F.

donde las plumas, depositadas durante varios días, se encontraban en estado de descomposición. Las muestras fueron sembradas por agotamiento en placas de Petri con medio de polvo de plumas e incubadas a 40°C por 48 horas a fin de realizar el aislamiento.

### Cultivo del microorganismo degradador de plumas

Los ensayos realizados en tubos con plumas enteras resuspendidas en solución salina basal se realizaron sin agitación a 40°C durante 72 horas.

### Efecto del tiempo de esterilización por calor húmedo sobre las plumas

Lotes de plumas enteras fueron autoclavadas (1 bar – 121°C) durante diferentes tiempos: 5, 10 y 15 min. Para evitar problemas de contaminación debido a un autoclavado insuficiente, aquellos lotes de plumas donde no se cumplió el tiempo de esterilización por calor húmedo de 15 min, se completó su esterilización químicamente empleando gas formaldehído. Para ello, cada lote fue envuelto en gasa y colocado en una campana de vidrio durante 12 horas, en donde previamente se introdujo un vaso de precipitado conteniendo 1 g/mL de  $KMnO_4$  en solución de formalina al 30%. Para verificar la esterilización, se tomaron muestras de plumas de cada lote y se incubaron a 40°C en tubos con caldo nutritivo. La ausencia de turbidez en dichos medios fue indicativo de una adecuada esterilización.

### Microscopía electrónica

Un cultivo de medio con plumas de 72 horas de incubación se utilizó para el procesamiento de las muestras. Estas fueron fijadas en glutaraldehído al 2,5% en tampón fosfato cacodilato 0,1 M, pH 7,2 a temperatura ambiente por 2 horas, lavadas 3 veces con tampón, postfijadas con 1%  $OsO_4$  en agua durante 2 horas a temperatura ambiente, deshidratadas gradualmente en etanol y óxido de propileno e incluidas en resina epóxica LX-112 (LADD Res. Inc, Burlington, USA). Las muestras fueron contrastadas con citrato de plomo y acetato de uranio, observadas y fotografiadas en un microscopio electrónico de transmisión HITACHI H-7100 a 75 Kv.

### Métodos analíticos y ensayos enzimáticos

A fin de realizar el seguimiento de la biomasa y la degradación de las plumas, se tomaron muestras de los jugos de fermentación al inicio y al final de la fermentación (72 horas). La biomasa fue determinada por turbidimetría (600 nm) y convertido su valor en peso seco (g/L) mediante una curva de calibración previamente realizada por gravimetría. La magnitud de la degradación de las plumas se determinó en base a la estimación de la concentración de los grupos amino libres en los sobrenadantes de los cultivos usando el método de ninhidrina de Rosen [12]. La actividad proteolítica fue estimada por el método Kunitz [11] utilizando caseína como sustrato. Una uni-

dad de actividad caseinolítica equivale a la cantidad de enzima capaz de producir un incremento de absorbancia de 1,0 unidad en un minuto.

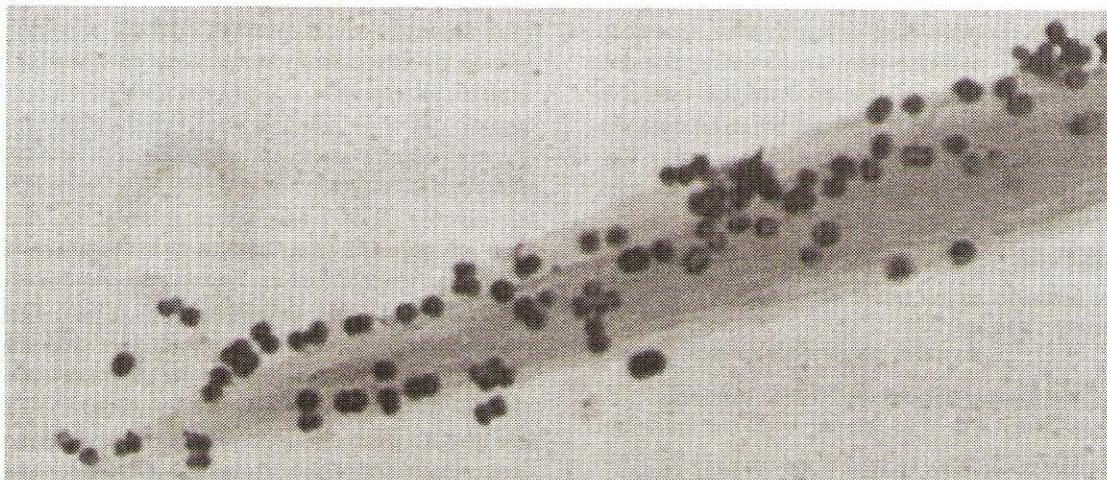
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A partir de una muestra tomada en un depósito colector de desechos avícolas se logró aislar una colonia bacteriana de color rojo y bordes definidos, con un halo claro alrededor. El medio selectivo de polvo de plumas ha sido utilizado con éxito para el aislamiento de microorganismos del género *Bacillus* [4, 16]. El crecimiento de colonias en dicho medio y la presencia de un halo claro alrededor de las mismas, sugirió que el microorganismo secretaba proteasas capaces de degradar dicho sustrato, para luego aprovechar como nutrientes los productos de la hidrólisis.

La cepa bacteriana aislada, codificada como LPB-3, fue identificada como *Micrococcus roseus* por el Centro Venezolano de Colección de Microorganismos (CVCVM), del Instituto de Biología Experimental de la Universidad Central de Venezuela y como *Kocuria rosea*, en el Instituto Pasteur, Francia. Esta bacteria aeróbica, perteneciente al género *Micrococcus* y re-clasificada en 1995 dentro del género *Kocuria* [13], ha sido objeto de estudios en relación a la estructura y propiedades del pigmento carotenoide que ella produce [6, 9, 14]; sin embargo, la capacidad degradadora de plumas no había sido reportada hasta ahora en este género bacteriano.

La observación al microscopio óptico de un frotis teñido con Gram de la cepa LPB-3 crecida en medio con plumas enteras, evidenció la presencia de cocos Gram positivos que se disponen aislados, en duplos y racimos irregulares, FIG. 1. Además, se observaron cúmulos de células adsorbidos a los restos de plumas, representando una ventaja estratégica para el microorganismo, al concentrar la cantidad de enzima secretada a un sitio específico y lograr un mejor aprovechamiento del sustrato.

Las micrografías muestran diversos cortes de la cepa *Kocuria rosea*, FIG. 2, donde la ultraestructura del microorganismo se revela como la de una bacteria Gram positiva típica. A saber, una pared celular gruesa y continua, constituida al menos por dos capas, que recubre la membrana citoplasmática. La matriz protoplasmática tiene aspecto granular y electrón denso, siendo más compacta hacia la periferia del coco y presentando zonas fibrilares centrales que podrían tratarse de cromatina. La alta densidad citoplasmática observada puede ser debida a la elevada densidad de ribosomas, lo que sugiere una síntesis activa de proteínas, posiblemente proteasas. Además, se aprecian estructuras citoplasmáticas grandes, redondeadas y electrón densas, de bordes difusos y sin membrana y otras más pequeñas, de bordes difusos y menor densidad electrónica, que corresponden a gránulos de polifosfato y de glucógeno, estructuras que constituyen reservas intracelulares de fósforo y carbono respectivamente.



**FIGURA 1. IMÁGENES DE MICROSCOPIA DE LUZ DE FROTIS TEÑIDOS CON GRAM DE LA CEPA *Kocuria rosea* CRECIDA EN MEDIO DE CULTIVO CON PLUMAS A 40°C (1.000X). SE EVIDENCIA LA PRESENCIA DE COCOS GRAM POSITIVOS QUE SE DISPONEN AISLADOS, EN DUPLOS Y CÚMULOS DE CÉLULAS ADSORBIDOS A RESTOS DE PLUMAS.**

Por otro lado, las micrografías destacan la presencia de planos de división múltiples y asimétricos, en lugar de las divisiones binarias simétricas generalmente encontradas en los microorganismos. Una posible explicación para este fenómeno es que sea un efecto fisiológico, debido a la presión selectiva impuesta y las restricciones nutricionales del medio de cultivo utilizado. Sin embargo, no se descarta que se trate de un mecanismo de división normal de *Kocuria rosea*, microorganismo que hasta la fecha ha sido poco estudiado.

La FIG. 3 muestra el estado físico de las plumas de los medios de cultivo cuando son inoculados con el microorganismo LPB-3 e incubados a 40°C durante 72 horas. Las observaciones diarias permitieron apreciar que la magnitud de la degradación de la pluma aumenta de forma progresiva, hasta que todo el material queratinoso que conforman las barbas desaparece dejando el raquis como un residuo parcialmente digerido a las 72 horas de incubación. La magnitud de la degradación de las plumas pudo ser cuantificada y se observó un incremento en la concentración de grupos amino libres a las 72 horas (4,5 mM) con relación al valor estimado al inicio del experimento (1,6 mM).

Concomitante a la degradación de las plumas, se observó un incremento de la turbidez del medio, indicativo de crecimiento bacteriano. Las estimaciones de peso seco celular mostraron valores superiores (0,55 g/L) a los obtenidos al inicio del experimento (0,20 g/L). Por otra parte, de acuerdo a la literatura [1] el 14% del peso seco celular de una bacteria corresponde a nitrógeno elemental; al revisar la formulación del medio de cultivo utilizado y realizar los cálculos correspondientes se obtiene que el cloruro de amonio del medio de cultivo (0,5 g/L) aporta 0,13 g/L de nitrógeno, cantidad que permite sustentar sólo el 64% de la biomasa obtenida. Todo lo cual reforzó la afirmación de que el microorganismo utiliza como sustrato fermentable, los productos de degradación de las plumas (aminoácidos y péptidos), como fuente de carbono, energía y

nitrógeno para su propagación. En concordancia con lo anterior, la actividad caseinolítica estimada en los jugos de fermentación, incrementó de 0,002 a 0,19 U/mL, indicativo de inducción en la secreción de proteasas al medio de cultivo por parte del microorganismo.

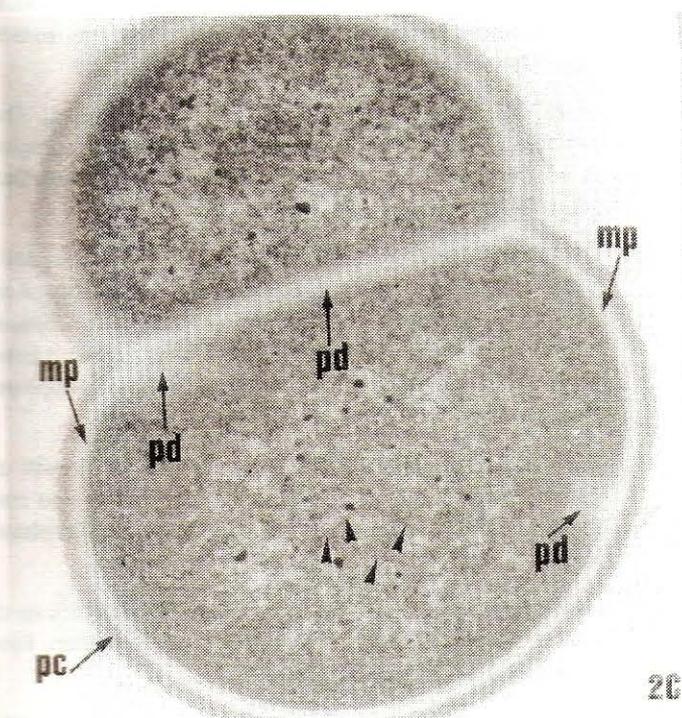
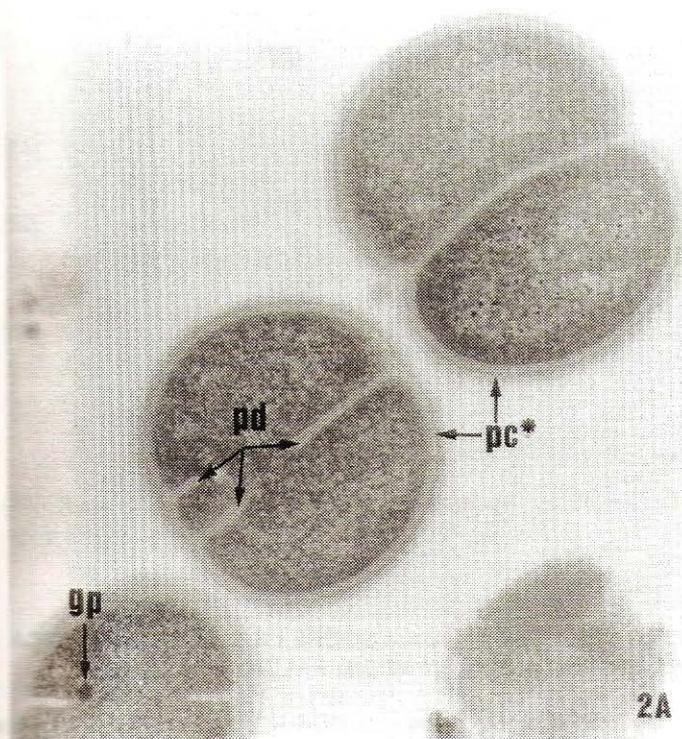
Ensayos similares con plumas enteras realizados a diferentes temperaturas de incubación, mostraron que el intervalo de temperatura donde se observó mayor densidad celular concomitante con una mayor degradación de las plumas, correspondía a 35-40°C.

Por otro lado, se observó que el tiempo requerido para lograr la biodegradación de las plumas se redujo al incrementar el tiempo de esterilización por calor húmedo (1 bar, 121°C). Las plumas esterilizadas 5 min por calor húmedo demoraron 16 días en ser degradadas, mientras que las plumas esterilizadas 10 y 15 min demoraron 8 y 3 días, respectivamente. Ello puede explicarse por el efecto de la alta presión y temperatura durante la esterilización por autoclave, lo cual resulta de la modificación de la estructura de las fibras queratinosas, haciéndolas más susceptibles al ataque queratinolítico. No obstante, este tratamiento físico resulta ser más rápido y menos drástico que el empleado por la Planta Proagro de Protinal, Edo. Carabobo, Venezuela, en la elaboración de la harina de plumas comercial (90 lb, 100°C, 45 min).

En la actualidad, en el Laboratorio de Procesos Biotecnológicos, UCV, se adelantan experimentos sobre la fisiología de la cepa LPB-3 de *Kocuria rosea*, la caracterización de su cinética de fermentación y la optimización del medio de cultivo con plumas mediante análisis de estadística inferencial.

## CONCLUSIONES

El aislamiento de la cepa LPB-3 de *Kocuria rosea* capaz de utilizar plumas como sustrato fermentable, abre la posibilidad



**FIGURA 2. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN DE CÉLULAS DE LA CEPA *Kocuria rosea*: LAS MICROFOTOGRAFÍAS MUESTRAN CORTES DE COCOS, EN LOS CUALES, SON VISIBLES PLANOS DE DIVISIÓN MÚLTIPLE CON SIMETRÍA VARIABLE (pd). LA PARED CELULAR (pc), ES GRUESA Y CONSTITUÍDA DE AL MENOS 3 CAPAS (pc\*). EN ALGUNOS COCOS, DEPENDIENDO DEL PLANO DE CORTE, PUEDE OBSERVARSE LA MEMBRANA PLASMÁTICA (mp), ASI COMO TAMBIÉN GRÁNULOS (gp), DE ALTA DENSIDAD ELECTRÓNICA SIN MEMBRANA CIRCUNDANTE QUE PUDIERAN CORRESPONDER A ACÚMULOS POLIFOSFÁTICOS. EL PROTOPLASMA CELULAR ES ELECTRÓN DENSO, HACIÉNDOSE MÁS COMPACTO HACIA LA PERIFERIA CELULAR; EN SU INTERIOR PUEDEN VERSE ALGUNAS MICROFIBRILLAS (CABEZA DE FLECHAS). 2A (x26.000), 2B (x35.000 X); 2C (x52.000).**

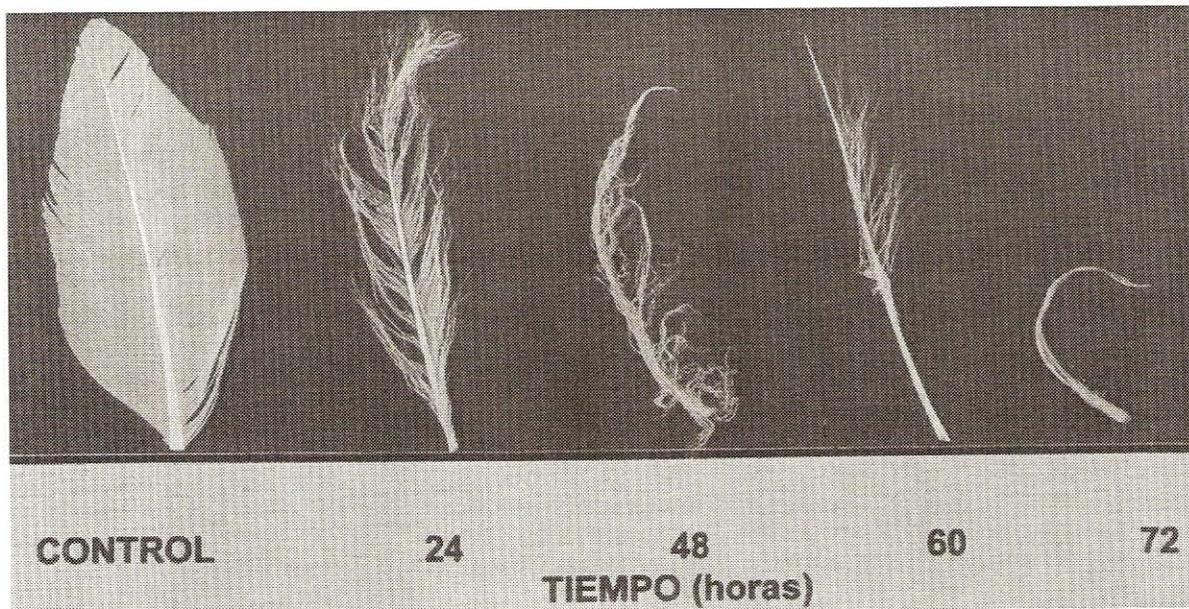


FIGURA 3. EFECTO DE LA ACTIVIDAD QUERATINOLÍTICA DE LA CEPA *Kocuria rosea* SOBRE LA INTEGRIDAD FÍSICA DE LAS PLUMAS A DIFERENTES TIEMPOS DE LA FERMENTACIÓN EN MEDIO SALINO A 40°C.

dad de valorizar este subproducto de las plantas beneficiadoras de aves para la producción biotecnológica de insumos de alto valor agregado. La realización de ensayos en condiciones controladas de crecimiento (fermentadores) y la caracterización bioquímica de las proteasas (queratinasas) secretadas por *K. rosea* serán de utilidad en el escalamiento y optimización de este tipo de procesos. Los análisis bromatológicos del hidrolizado proteico obtenido, así como ensayos de digestibilidad *in vitro* son necesarios a fin de evaluar su uso potencial como suplemento en la nutrición animal.

#### AGRADECIMIENTO

El presente estudio fue financiado mediante fondos del proyecto 88 de transferencia inmediata del Programa de Nuevas Tecnologías del Banco Interamericano de Desarrollo y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y, 09-12-4044-97 del Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] BAILEY, J.; OLLIS, D. **Biochemical engineering Fundamentals**. 2<sup>nd</sup>. Edition. Mc GrawHill: 228-306. 1986.
- [2] BAKER, D.H.; BLITENTHAL, R.C.; BOEBEL, K.P.; CZRNECKI, G.L.; SOUTHERN, L.L.; WILLIS, G.M. Protein amino-acid evaluation of steam-processed feather meal. **Poult. Sci.** 60: 1865-1872. 1981.
- [3] BHARGAVA, K.K.; O'NEIL, J.B. Composition and utilization of poultry by-product and hydrolyzed feather meal in broiles diets. **Poult. Sci.** 54: 1511-1518. 1975.
- [4] BRIÓN, D.; VIDAL, L.; PIÑERO, J.; COELLO, N. Utilización de sustratos no convencionales: Aislamiento e identificación de bacterias degradadoras de plumas. **XLV Convención Anual de ASOVAC**. Barquisimeto, estado Lara, Venezuela. 17-22, Noviembre: 20-25. 1996.
- [5] BURGOS, A.; FLOYD, J. I.; STEPHENSON, E. L. The amino-acid content and availability of different samples of poultry by-product meal, and feather meal. **Poult. Sci.** 53: 198-203. 1974.
- [6] CHATTOPADHYAY, MK.; JAGANNADHAM, MV.; VAIRAMANI, M.; SHIVAJI, S. Carotenoid pigments of an antarctic psychrotropic bacterium *Micrococcus roseus* temperature dependant biosynthesis, structure and interaction with synthetic membranes. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 239 (1): 85-90. 1997.
- [7] ELMAYERGUI, H., SMITH, R. Influence of growth of *Streptomyces fradie* on pepsin HCl digestibility and methionine content of feather meal. **Canadian J. Microbiol.** Vol I (17): 1067-1072. 1971.
- [8] HARRAP, B. S.; WOODS, E. F. Soluble derivatives of feather keratin. Molecular weight and conformation. **Biochem. J.** 92: 19-26. 1964.
- [9] JAGANNADHAM, MV.; NARAYANAN, K.; RAO, CM.; SHIVAJI, S., *In vivo* characteristics and localization of carotenoid pigments in psychrotropic and mesophilic *Micrococcus roseus* using photoacoustic spectroscopy. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 227 (1): 221-226. 1996.

- [10] FEDERACIÓN NACIONAL DE AVICULTURA. Estadísticas producción de carne de pollo. Venezuela. 1er. Semestre. **REVISTA FENAVI**. 55pp. 1996.
- [11] KUNITZ, M. Crystalline soybean trypsin inhibitor II. General properties. **J. Gen. Physiol.** 30: 291-310. 1947
- [12] ROSEN, H. A modified Ninhydrin Colorimetric analysis for amino acids. **Arch. Biochem. Biophys.** 67: 10-15. 1957.
- [13] STACKEBRANDT, E.; KOCH, C.; GVOZDIK, O.; SHUMANN, P. Taxonomic dissection of the genus *Micrococcus*: *Kocuria* gen. nov., *Nesterenkonia* gen. nov., *Kytococcus* gen. nov., *Dermacoccus* gen. nov., and *Micrococcus*. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 4: 682-692. 1995.
- [14] UNGERS, GE.; COONEY, J. Isolation and characterization of carotenoid pigments of *Micrococcus roseus*. **J. Bacteriol.** 96 (1): 234-241. 1968.
- [15] VIDAL, L.; COELLO, N. Estudio de la biodegradación de plumas de aves por un bacilo Gram positivo (LPB-2). **XLVIII Convención Anual de ASOVAC**. Maracaibo, Estado Zulia, Venezuela. 9-13, Noviembre: 330-331. 1998.
- [16] WILLIAMS, C. M.; SHIH, J. C. Enumeration of some microbial groups in thermophilic poultry waste digesters and enrichment of a feather-degrading culture. **J. Appl. Bacteriol.** 67: 25-35. 1989.
- [17] WILLIAMS, C. M.; LEE, C.G.; GARLICH, J.D.; SHIH, J.C. Evaluation of a feather fermentation product, feather lysate, as a feed protein. **Poult. Sci.** 70: 85-94. 1991.
- [18] WESSELS, J.P.H. A study of the protein quality of different feather meals. **Poult. Sci.** 51: 537-541. 1972.
- [19] XIANG, L.; CHUNG-GINN, L.; CASALE, E.S.; SHIH, J.C. Purification and Characterization of a Keratinase from a Feather-Degrading *Bacillus licheniformis* Strain. **Appl. and Environm. Microbiol.** 58(10): 3271-3275. 1992.