

土壤環境中羽毛分解菌之篩檢

陳麗淑、羅致述*

農委會農業藥物毒物試驗所

一、中文摘要

本研究於農業環境中篩選到4株羽毛分解菌為液化澱粉芽孢桿菌 LA-fw-1 (*Bacillus amyloliquefaciens* LA-fw-1)、液化澱粉芽孢桿菌 TSA-fw-1 (*B. amyloliquefaciens* TSA-fw-1)、液化澱粉芽孢桿菌 TSA-fw-19 (*B. amyloliquefaciens* TSA-fw-19) 及短小芽孢桿菌 FGJ-424 (*B. pumilus* FGJ-424)。對於 2 %羽毛分解量分別為49.9 %、50.1 %、46.7 %及46.8 %。各羽毛分解液pH值介於8.8~9.1。羽毛分解液之可溶性蛋白質分別為5853.7 $\mu\text{g/mL}$ 、5032.8 $\mu\text{g/mL}$ 、6022.7 $\mu\text{g/mL}$ 及5445.6 $\mu\text{g/mL}$ ；角蛋白酶活性分別為19.2 U/ml、17.9 U/ml、13.6 U/ml及18.4 U/ml。其中，可溶性蛋白質含量為對照組(2 %羽毛無菌分解液) 4~9倍，顯示本研究之羽毛分解菌確實可分解羽毛並釋出養份。但利用羽毛分解液澆灌小白菜則無明顯效果。未來將嘗試建立羽毛分解的最適條件，及純化菌株酵素直接分解羽毛製作羽毛粉，並研究羽毛粉在農業肥料及畜牧飼料之應用性。

關鍵字：羽毛 (Feather)、可溶性蛋白 (Soluble protein)、角蛋白酶 (Keratinase)

二、前言

由於現代化大規模的家禽養殖業、屠宰場及肉類加工場等，大量生產羽毛廢棄物，據統計羽毛類廢棄物於100年有27,889公噸，101年有26,058公噸，羽毛廢棄物在環境中的累積日益增多，已成為固體廢棄物處理問題的一部分。羽毛的主要成分是角蛋白，國內外有許多研究探討羽毛廢棄物之利用性，如 Choi 與 Nelson (1996) 利用水解羽毛粉作為緩效性氮肥；Ramakrishnan *et al.* (2011) 利用羽毛粉製作微生物培養基；曾與楊 (2012) 提及羽毛分解液可作為液態有機質肥料與動物飼料添加物；Grazziotin *et al.* (2006) 指細菌分解羽毛的產物可做為動物飼料；Yong *et al.* (2013) 亦提及分解羽

毛釋出之養份可增加飼料養分或作為肥料使用。本研究希望能自農業環境中篩檢出有潛力之羽毛分解菌，評估其分解液之利用性。

三、材料與方法

(一) 供試菌株

1. 環境分離菌株：自行分離菌株 LA-fw-1~20、TSA-fw-1~20、ISP2-fw-1~20、FGJ-424。
2. 標準菌株：自食工所購買標準菌株 *Bacillus licheniformis* BCRC14353 及 *B. licheniformis* BCRC11594。

(二) 羽毛來源：以市售雞毛撻子之雞羽為主。

(三) 植株品種：小白菜 (*Brassica rapa* L var. *chinensis*) 購自興農公司。

(四) 培養基

1. 1%酪蛋白磷酸緩衝液：0.7 g/L KH_2PO_4 ，1.4 g/L K_2HPO_4 ，0.5g/L NaCl，0.1 g/L MgSO_4 ，10 g/L casein，pH 7.2，15 g/L agar (Cai *et al.*, 2008)。
2. 1%、2%羽毛磷酸緩衝液：0.7 g/L KH_2PO_4 ，1.4 g/L K_2HPO_4 ，0.5g/L NaCl，0.1 g/L MgSO_4 ，pH 7.2及雞羽毛（整根、1%、2%）。
3. 其他培養基：Luria-Bertani agar (LA)、Luria-Bertani broth (LB)。

(五) 羽毛分解菌之篩檢

1. 酪蛋白分解力分析

將供試菌株以LA培養基活化20小時後，以滅菌牙籤沾取單一菌落，點於酪蛋白培養基上，於30 °C培養24小時後，觀察菌落周圍是否出現透明環，拍照並記錄菌落及透明環大小。

2. 羽毛分解力-10 ml試管

配製羽毛分解液並分裝10 ml於螺旋式管中，添加一根完整羽毛，進行高溫高壓滅菌備用。將供試菌株於LA上活化並以5 ml LB液培20小時後，調整菌量為 $\text{OD}_{600} = 0.3$ ，並吸取100 μl 加入試管中，於37 °C下培養144小時後觀察羽毛的完整性，並以不添加待測菌株者作為空白組。

3. 羽毛分解力-1% 羽毛 50 ml 分解液

配製50 ml之羽毛分解液，並添加0.5g (1%) 雞羽毛於250 ml 三角瓶中，高溫滅菌後，加入已活化增量於LB中20小時之供試菌株，菌液為 $OD_{600} = 0.3$ (10^8 CFU/mL)，體積為 2% (v/v)。將三角瓶於37°C、150 rpm、暗室下培養6天後，以ADVANTEC No.1濾紙進行過濾，將羽毛殘留物放入 65°C 烘箱烘乾後，秤重並以下列公式計算羽毛重量損失率 (%)；濾液則偵測其pH值及後續蛋白質分析。對照組為無菌分解液。

$$\text{羽毛損失率 (\%)} = \frac{0.5 \text{ (g)} - \text{殘留重量}}{0.5 \text{ (g)}} \times 100 \text{ (\%)}$$

4. 羽毛分解力-2% 羽毛 200 ml 分解液

配製200 ml之羽毛分解液，並添加 4 g (2%) 雞羽毛於500ml 三角瓶中，高溫滅菌後，加入已活化增量於LB中24小時之供試菌株，菌液為 $OD_{600} = 0.3$ (10^8 CFU/mL)，體積為 2% (v/v)。將三角瓶於37°C、150 rpm、暗室下培養6天後，ADVANTEC No.1濾紙進行過濾，將羽毛殘留物放入 65 °C烘箱烘乾後，秤重並計算羽毛重量損失率 (%)；濾液則偵測其pH值及生化檢驗，以比較提高產能時各指標之變化。對照組為無菌分解液。

(六) 羽毛分解液成分分析

1. 可溶性蛋白分析

以Folin-Phenol (Lowry) 測定法進行 (陳等人, 2008)。試劑包含：A (含2% 無水碳酸鈉, 0.02% 酒石酸鈉鉀 (W/V))、B (1% $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (W/V))、C (混合A 與B, 比例為100: 1)、D (1N NaOH)、E (Folin & Ciocalteu's phenol 試劑)。用來製作檢量線的標準品為：BSA (Bovine Serum Albumin) 標準液 (貯存液2 mg/mL)，BSA標準曲線配製濃度為 25 μ g/mL、50 μ g/mL、100 μ g/mL及 250 μ g/mL。先將適量稀釋好的分解液取0.2 mL 到試管中，添加 C 和 D 試劑各 0.2 mL，混勻靜置 20 分鐘後，再加入E 試劑，混勻後在黑暗處靜置20分鐘。吸光值以 OD_{650} 測量。

2. 角蛋白酶活性分析

取0.2 mL經適當稀釋分解液，加入0.8 ml之 0.4% (w/v) keratin

azure溶液（溶於10 mM Tris-HCl buffer, pH 8.5）之反應基質充分混勻，於50℃下震盪反應 60 min，再以 4 °C、10000 rpm 離心 10 min，取上清液以 595 nm測定吸光值。角蛋白分解酶之酵素活性定義為：使 595 nm吸光值增加0.1/小時者稱為一酵素活性單位（U）（Letourneau *et al.*, 1998）。

（七）盆栽試驗

土壤採自本所公害大樓後方靠近竹林之田區，經風乾3天、混拌、過篩（2 mm），與振詠牌育苗泥炭土（TREF-11B）等體積混合後，於5吋盆中填裝1公斤混合好之土壤備用。試驗於250 × 200 × 170 cm³網室中進行。

裝盆後之土壤預先於定植前兩週開始澆灌，每週一、三、五時澆灌稀釋濃度50倍之各羽毛分解液 50 ml。在淺盆中以培養土淺埋小白菜種子100-120顆育苗，待小白菜生長出2片真葉後（約10天），留存株高一致之健康植株者移植於預先澆灌兩週之5吋盆土壤中，每週一、四時澆灌稀釋濃度50倍之各羽毛分解液 50 ml。每天視氣候情況澆水至收成。並以地下水取代分解液處理，作為土質肥力對照（CK）；每處理五重複。實驗採完全隨機設計法（completely randomized design, CRD）排列。小白菜在種植第32天採收，調查植株高度、地上部植株鮮重、乾重。

（八）菌種鑑定

1. DNA抽取：細菌染色體DNA之萃取係利用Tissue & Cell Genomic DNA Purification Kit（Hopegen Biotechnology Development Enterprise, Taiwan, R.O.C.）進行。
2. 16S rDNA：細菌16S rDNA通用引子對：11F（5'-GTTTGATCCTGGCTCAG-3'，Kane *et al.*, 1993）及1492R（5'-TACCTTGTTACGACTT-3'，Lin and Stahl, 1995）進行聚合酶連鎖反應（PCR），產物長度為1481 bp。反應條件為：94 °C 5分鐘，94 °C 1分鐘、55 °C 2分鐘、72 °C 2分鐘、共35個循環，72 °C 5分鐘。於MJ Research PTC-200迴溫循環器中進行反應，增殖16S rDNA。利用洋菜膠膠體水平式電泳分析增殖後之DNA產物後，委由明欣生物科技公司以核酸自動定序儀進行核苷酸定序。並利用網際網路National Center for Biotechnology Information（NCBI:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 以BLAST之程式進行線上基因庫 (GenBank) 之查詢與比對。

3. *gyrB* 基因： *gyrB* 基因引子對41F (5'-GAAGTCATCATGACCGTTCTGCAYGCNGGNGGNAARTTYGA-3') 及44R (5'-AGCAGGGTACGGATGTGCGAGCCRTCNCRCRCNGTCAT-3') 針對 *Bacillus* 屬菌種進行種之鑑定。反應條件為：94 °C 3分鐘，94 °C 1分鐘、55 °C 1分鐘、72 °C 1.5分鐘、共30個循環，72 °C 5分鐘 (Yamamoto and Harayama, 1995)，產物長度為1200 bp。

四、結果

(一) 羽毛分解菌之篩檢

1. 酪蛋白分解力分析

利用酪蛋白培養基進行快篩得知63株菌株中，有31株菌株 (表一) 具有酪蛋白水解酶之特性。從中挑選4株透明環/菌落比例較大者：LA-fw-1、TSA-fw-1、TSA-fw-19、FGJ-424及專利菌株11594與14353共6株菌，進行羽毛分解液之培養。

表一、31株菌株在酪蛋白培養基上產生透明環之大小及菌落比例。

Table 1. The size of clear zone and the ratio of clear zone/colony of 31 isolates on casein plate.

菌株	透明環大小 (mm)	透明環/菌落
ISP2-fw-1	13.5 ± 0.7	2.8
ISP2-fw-2	8.2 ± 1.3	6.1
ISP2-fw-6	5.3 ± 2.6	4.6
ISP2-fw-7	7.3 ± 1.9	6.3
ISP2-fw-8	16.0 ± 0.0	3.4
ISP2-fw-10	2.3 ± 2.0	2.3
ISP2-fw-14	7.7 ± 1.2	6.6
ISP2-fw-15	9.0 ± 0.8	7.7
ISP2-fw-16	1.3 ± 1.8	1.3
ISP2-fw-17	9.7 ± 0.4	7.3
LA-fw-1	11.3 ± 0.5	8.5
LA-fw-2	3.3 ± 0.2	3.3
LA-fw-3	14.8 ± 0.2	2.6
LA-fw-7	12.7 ± 0.2	7.6
LA-fw-9	16.2 ± 0.2	2.4
LA-fw-10	16.0 ± 0.4	2.5
LA-fw-15	14.7 ± 0.5	2.9
LA-fw-19	2.8 ± 0.2	2.8
LA-fw-20	8.7 ± 0.6	5.8
TSA-fw-1	11.8 ± 1.9	7.9
TSA-fw-2	18.2 ± 0.8	1.0
TSA-fw-3	17.3 ± 0.2	1.0
TSA-fw-7	15.3 ± 0.2	3.5
TSA-fw-14	16.0 ± 0.4	2.2
TSA-fw-15	14.8 ± 0.2	5.9
TSA-fw-16	13.3 ± 0.6	4.7
TSA-fw-18	15.8 ± 0.2	3.3
TSA-fw-19	11.8 ± 0.2	10.1
FGJ-424	9.7 ± 0.6	7.3
11594 (<i>B. licheniformis</i>)	3.5 ± 1.1	3.5
14353 (<i>B. licheniformis</i>)	7.2 ± 1.4	5.4

Mean ± SD (n=3)

2. 羽毛分解力-10 ml試管

將LA-fw-1、TSA-fw-1、TSA-fw-19、FGJ-424及專利菌株11594、14353接種羽毛培養基，此階段實驗進行兩重複並於144小時後觀察到羽毛被分解之情形。結果得知此四株菌LA-fw-1、TSA-fw-1、TSA-fw-19及FGJ-424均具羽毛分解能力（圖一）。



圖一、不同分離株將雞羽毛分解之情形（144小時）。

Fig. 1. Degradation of feathers by bacterial isolates at 144 hr.

3. 羽毛分解力-1 %羽毛50 ml分解液

將三次實驗結果進行統計（表二），專利菌株之重量損失（72.7~77.1%）及角蛋白酶活性（18.9~25.4 U/ml）均較高。所有測試菌株於培養6天後均使培養基的pH值上升（8.4~9.0）。可溶性蛋白濃度以TSA-fw-1分解液（4358.9 $\mu\text{g/ml}$ ）最高，其次為專利菌株11594（4214.4 $\mu\text{g/ml}$ ）。角蛋白酶活以專利菌株11594（25.4 U/ml）最好，14353（18.9 U/ml）次之。

表二、不同分離菌株以 1 %羽毛培養後（6天）之pH、重量損失率、可溶性蛋白及角蛋白酶活性。

Table 2. The pH, feather weight loss, soluble protein, and keratinase activity of different bacterial isolates incubated with 1 % feather after 6 days.

分解液	pH	重量損失 (%)	可溶性蛋白 ($\mu\text{g/ml}$)	角蛋白酶活 性 (U/ml)
無菌分解液	7.1 \pm 0.1	3.1 \pm 2.2	440.9 \pm 16.2	0.0 \pm 0.0
11594	9.0 \pm 0.1	72.7 \pm 7.7	4214.4 \pm 218.7	25.4 \pm 7.7
14353	9.0 \pm 0.0	77.1 \pm 3.9	4047.8 \pm 375.7	18.9 \pm 2.5
LA-fw-1	8.7 \pm 0.1	61.7 \pm 5.5	3797.8 \pm 431.7	10.7 \pm 3.8
TSA-fw-1	8.8 \pm 0.1	62.3 \pm 4.0	4358.9 \pm 193.6	11.6 \pm 0.9
TSA-fw-19	8.8 \pm 0.1	63.9 \pm 6.1	3436.7 \pm 412.5	13.6 \pm 5.1
FGJ-424	8.4 \pm 0.1	56.9 \pm 7.3	3714.4 \pm 403.8	12.9 \pm 5.7

Mean \pm SD (n=3)

4. 羽毛分解力-2 % 羽毛 200 ml分解液

由三次培養之數據平均（表三）可知，所有測試菌株於培養6天後均使培養基的pH值上升（8.7~9.1），重量損失上TSA-fw-1菌株較好（50.1%）；可溶性蛋白含量上TSA-fw-19（6022.7 $\mu\text{g/mL}$ ）較好。角蛋白酶活性上則以LA-fw-1（19.2 U/ml）較高。與以1% 50ml 羽毛培養液（表二）之結果相比，2 %羽毛 200 ml分解液之重量損失下降，但可溶性蛋白增加。角蛋白酶活性略低。

表三、不同分離菌株以 2%羽毛培養後（6天）之pH、重量損失率、可溶性蛋白及角蛋白酶活性。

Table 3. The pH, feather weight loss, soluble protein, and keratinase activity of different bacterial isolates incubated with 2 % feather after 6 days.

分解液	pH	重量損失 (%)	可溶性蛋白 ($\mu\text{g/mL}$)	角蛋白酶活 性 (U/ml)
無菌分解液	6.9 \pm 0.1	4.2 \pm 0.3	639.8 \pm 20.5	0.0 \pm 0.0
11594	8.7 \pm 0.4	36.5 \pm 7.8	2593.7 \pm 486.4	13.3 \pm 3.0
14353	8.8 \pm 0.1	40.3 \pm 13.0	3454.1 \pm 1470.7	14.5 \pm 3.4
LA-fw-1	9.1 \pm 0.1	49.9 \pm 5.2	5853.7 \pm 1168.0	19.2 \pm 6.4
TSA-fw-1	8.8 \pm 0.1	50.1 \pm 3.6	5032.8 \pm 1209.3	17.9 \pm 4.0
TSA-fw-19	9.0 \pm 0.1	46.7 \pm 3.9	6022.7 \pm 827.2	13.6 \pm 5.5
FGJ-424	8.9 \pm 0.2	46.8 \pm 5.3	5445.6 \pm 1313.4	18.4 \pm 5.9

Mean \pm SD (n=3)

(二) 盆栽試驗

本實驗於定植前兩週開始，每週澆灌3次50倍稀釋濃度 50 ml各羽毛分解液；定植後則每週澆灌2次羽毛分解液，共計12次。小白菜在種植第32天採收，並由植株高度、地上部植株鮮重、乾重之結果得知告處理間無明顯差異（表四）。

表四、羽毛分解液對小白菜之生長效果。

Table 4. Effects of feather degradation buffers on the growth of *Brassica rapa* L var. *chinensis*.

處理	平均高度 (cm)		鮮重 (g)	乾重 (g)
	定植 (11天)	採收 (32天)		
地下水	5.18 ± 0.25	20.06 ± 1.16	11.00 ± 3.15	0.72 ± 0.16
無菌培養液	5.18 ± 0.37	20.14 ± 1.76	12.53 ± 2.62	0.92 ± 0.16
14353	5.02 ± 0.28	21.66 ± 1.73	11.83 ± 1.50	0.77 ± 0.13
11594	5.16 ± 0.31	20.58 ± 2.16	11.54 ± 2.64	0.79 ± 0.21
LA-fw-1	5.02 ± 0.28	21.20 ± 0.66	12.02 ± 1.32	0.79 ± 0.08
TSA-fw-1	5.10 ± 0.26	20.66 ± 1.17	11.42 ± 2.56	0.79 ± 0.15
TSA-fw-19	5.12 ± 0.37	19.86 ± 1.37	10.16 ± 1.62	0.73 ± 0.12
FGJ-424	5.14 ± 0.39	20.42 ± 0.54	12.10 ± 2.48	0.79 ± 0.15

Mean ± SD (n=5)。

(三) 菌種鑑定

菌種 LA-fw-1、TSA-fw-1 及 TSA-fw-19 抽取DNA進行 16S rDNA PCR，將序列送定序並以NCBI資料庫進行比對後，得知此三株菌均為 *Bacillus* sp.，但菌株種名無法鑑別，再以 *gyrB* 基因進行種之鑑定得知，此三株菌均為液化澱粉芽孢桿菌 (*B. amyloliquefaciens*)，而 FGJ-424 菌株為短小芽孢桿菌 (*B. pumilus*)。

表五、LA-fw-1之16S rDNA 引子對 (11F/1492R) 鑑定結果。

Table 5. The DNA Identity of LA-fw-1 by 16S rDNA primers (11F/1492R).

LA-fw-1(1153 letters) Description	Query cover	Ident
Bacillus amyloliquefaciens strain GC49 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	99%(1142/1144)
Bacillus subtilis strain EPP2 2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	99%(1142/1144)
Bacillus sp. CZB4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence >gb KF578078.1 Bacillus sp. CZB9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	99%(1141/1143)
Bacillus tequilensis strain GZAL15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	99%(1142/1145)
Bacillus methylotrophicus strain SY33 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	99%(1141/1144)

表六、LA-fw-1之gyrB 基因引子對 (41F/44R) 分析鑑定結果。

Table 6. The DNA Identity of LA-fw-1 by gyrB primers (11F/1492R).

LA-fw-1(944 letters) Description	Query cover	Ident
Bacillus amyloliquefaciens strain IARI-R-25 DNA gyrase subunit B (gyrB) gene, partial cds	100%	99% (940/946)
Bacillus amyloliquefaciens strain IARI-AR25 DNA gyrase subunit B (gyrB) gene, partial cds	100%	99% (940/946)
Bacillus amyloliquefaciens LFB112, complete genome	100%	99% (940/946)
Bacillus amyloliquefaciens strain Y41a DNA gyrase subunit B (gyrB) gene, partial cds	100%	99% (940/946)
Bacillus amyloliquefaciens strain CH92 DNA gyrase subunit B (gyrB) gene, partial cds	100%	99% (940/946)

五、討論

本實驗所分離的4株潛力菌株均具有羽毛分解的能力，但重量損失、可溶性蛋白含量及角蛋白酶活性尚未見明顯之相關性，可能原因為此4株菌酵素活性相差有限。

Suntornsuk 與 Suntornsuk (2003) 曾利用 1%、3%及 5%等不同羽毛添加量培養 *Bacillus* sp. FK46，得知羽毛分解菌的生長隨著羽毛添加量增加而增加，但分解率則隨羽毛添加量的增加而降低。顯示過量的羽毛用量會導致基質抑制效應的增加，造成羽毛分解率的降低。Cheng *et. al* (1995) 的研究亦指使用 *B. licheniformis* PWD-1分解菌，在羽毛量為 1%時的蛋白酶活性最大。李等人 (2006) 的研究也認為當羽毛添加量超過 1% 時對角蛋白酶活性的增加沒有很大的影響。本實驗結果也顯示，羽毛由 1% 增加至 2%時，羽毛分解率下降，對角蛋白酶活性影響不明顯。

Suntornsuk 與 Suntornsuk (2003) 研究亦提出在 pH 9時，羽毛分解菌之生長、羽毛分解率及角蛋白酶活性均最大。

本研究結果顯示此4株羽毛分解菌確實可分解羽毛釋出養份，但在應用上對小白菜之生長效果不明顯。簡與莊 (1997) 利用廢棄香菇木屑製作三種堆肥配方進行小白菜栽培，其植株鮮重、乾重均較本次試驗結果好。顯示本次盆栽試驗之小白菜生長勢尚未達最佳狀態，將重新調整栽培介質。

因此，未來將嘗試在1%、pH9、250rpm、 $10^6\sim 10^8$ cell下進行羽毛分解液的效應評估。也將嘗試建立羽毛分解的最適條件，及純化菌株酵素直接分解羽毛製作羽毛粉，並研究羽毛粉在農業肥料及畜牧飼料之應用性。

六、參考文獻

1. 李京華、江善容、殷麗容 2006 角蛋白酶之生產菌篩選、純化及其特性 國立海洋大學碩士論文。
2. 陳文嬪、黃新翔、王楨軫、張文綺、羅暉勛、吳建一 2008 雞羽毛分解菌株之篩選及影響分解羽毛能力之環境因子的探討 環境污染控制評估研討會。
3. 曾宥紘、楊秋忠 2012 菩提奇異球菌(*Deinococcus ficus*) CC-ZG207之羽毛分解液作為速效性液肥之研究 臺中區農業改良場研究彙報 115:53-62。

4. 簡宣裕、莊作權 1997 廢棄香菇木屑堆肥研製及對小白菜之肥效 中華農業研究 46 (1) : 70-81。
5. Cai, C.G., B. G. Lou, and X.D. Zheng, 2008 Keratinase production and keratin degradation by a mutant strain of *Bacillus subtilis*. Journal of Zhejiang University Science B 9 (1) : 60-67.
6. Cheng, S. W., H. M. Hua, S. W. Shena, H. Takagia, M. Asanoab, and Y. C. Tsai, 1995 Production and Characterization of Keratinase of a Feather-degrading *Bacillus licheniformis* PWD-1. Bioscience Biotechnology & Biochemistry 59 (12) : 2239-2243.
7. Choi, J. M. and P. V. Nelson, 1996 Developing a slow-release nitrogen fertilizer from organic sources: II. using poultry feathers. Journal of the American Society for Horticultural Science 121 (4) :634-638.
8. Grazziotin, A., F.A. Pimentel, E.V. de Jong, and A. Brandelli, 2006 Nutritional improvement of feather protein by treatment with microbial keratinase. Animal Feed Science and Technology 126:135-144.
9. Kane, M.D., L. K. Poulsen, and D. A. Stahl, 1993 Monitoring the enrichment and isolation of sulfate-reducing bacteria by using oligonucleotide hybridization probes designed from environmentally derived 16S rRNA sequences. Applied and environmental microbiology 59:682 – 686.
10. Lin, C.Z. and D.A. Stahl, 1995 Taxon-specific probes for the cellulolytic genus fibrobacter reveal abundant and novel equine-associated populations. Applied and Environmental Microbiology 61:1348-1351.
11. Letourneau, F., V. Soussotte, P. Bressollier, P. Branland, and B. Verneuil, 1998 Keratinolytic activity of *Streptomyces* sp. S.K1-02 a new isolated strain. Letters in Applied Microbiology 26 (1) :77-80.
12. Ramakrishnan, J., H. Balakrishnan, S. T. K. Raja, N. Sundararamakrishnan, S. Renganathan, and V. N. Radha, 2011

- Formulation of economical microbial feed using degraded chicken feathers by a novel *Streptomyces* sp. mitigation of environmental pollution. Brazilian Journal of Microbiology 42:825-834.
13. Suntornsuk, W., and L. Suntornsuk, 2003 Feather degradation by *Bacillus* sp. FK 46 in submerged cultivation. Bioresource Technology 86:239-243.
 14. Yamamoto, S., and S. Harayama, 1995 PCR Amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains. Applied and Environmental Microbiology 61 (3) :1104-1109.
 15. Yong, B., B. Q. Yang, and H. Feng, 2013 Efficient degradation of raw chicken feather into soluble peptides and free amino acids by a newly isolated *Bacillus subtilis* S1-4. Research Journal of Biotechnology 8 (9) :48-55.

Isolation and identification of feather-degrading bacterial in soil

Li-shu Chen and Chi-chu Lo*

Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute

Four bacteria isolated from agricultural environment were able to degrade feather. The feather degradation rates of *Bacillus amyloliquefaciens* LA-fw-1, *B. amyloliquefaciens* TSA-fw-1, *B. amyloliquefaciens* TSA-fw-19 and *B. pumilus* FGJ-424 were 49.9%, 50.1%, 46.7% and 46.8%, respectively. The pH of degradation buffers were increased from 7.2 to 9.1. The soluble proteins in degradation buffers were 5853.7 $\mu\text{g/mL}$, 5032.8 $\mu\text{g/mL}$, 6022.7 $\mu\text{g/mL}$ and 5445.6 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The keratinase activities of bacteria were 19.2 U/ml, 17.9 U/ml, 13.6 U/ml and 18.4 U/ml, respectively. The concentration of soluble proteins in degradation buffers were 4~9 times high than that of control (buffer with 2% feather only). However, the use of degradation solution for the growth of *Brassica rapa* L var. *chinensis* was not effective. In the future, we will try to set up the optimum condition for feather degradation, and to use purified enzyme to produce feather meal. The application of feather meal in fertilizers and animal feeds will also be investigated.

Key word : Feather, Soluble protein, Keratinase