اثر متابولیت‌های حاصل از تجزیه میکروبی پر مرغ بر رشد کاهو

لیلی احمدی، کاظم خاوازی[1]، ژیلا بهارلوئی و محمدحسین داودی

دانشجوی گروه خاکشناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اصفهان (خوراسگان)؛ leili.ahmadi5@yahoo.com

استاد مؤسسه تحقیقات خاک و آب، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی؛ khavazik@yahoo.com

استادیار گروه خاکشناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اصفهان (خوراسگان)؛ j.baharlouei@khuisf.ac.ir

استادیار مؤسسه تحقیقات خاک و آب، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی؛ davoodi_mh@yahoo.com

ص 229 - 241

دریافت: 1400/6/22 و پذیرش: 1400/10/29

چکیده

در این مطالعه برای تولید کود با مواد طبیعی، از باکتری‌های تولیدکننده آنزیم کراتیناز به‌منظور تجزیه پر مرغ که متشکل از پروتئین کراتین است استفاده گردید. تعداد 29 نمونه خاک از عمق صفر تا سی سانتی متری مزارع کشاورزی جمع‌آوری شد و با پر مرغ مخلوط گردید. پس از سه هفته از خاک‌های مخلوط با پر 31 جدایه که قادر به رشد بر روی محیط کشت اختصاصی پودر پر جامد (Feather Meal Agar, FMA) بودند جداسازی شدند. ایزوله‌ها به محیط مایع حاوی پر انتقال داده شدند و توان تجزیه پر توسط آنها بررسی گردید. تأثیر محلول حاصل از تجزیه پر بر رشد کاهو در قالب طرح کاملاً تصادفی در گلخانه بررسی شد. تیمارهای آزمایش شامل محلول‌پاشی با سه محلول حاصل از تجزیه پر مرغ (gh1، b1، c11) و محلول‌پاشی با آب مقطر (شاهد) بودند. نتایج نشان داد تعداد هشت جدایه با تولید آنزیم کراتیناز قادر به تجزیه کامل پر در طول هفت روز بودند. بالاترین فعالیت آنزیم کراتیناز با تجزیه کامل پر معادل U/ml 56/8 مربوط به جدایه gh1 *Bacillus methylotrophicus* بود. همچنین حداکثر غلظت اسیدآمینه آزاد، در محیط کشت جدایه c11 *Bacillus siamensis* معادل µg/ml 1065 مشاهده شد. سه محلول حاصل از تجزیه پر تأثیر معنی‌داری در سطح یک درصد بر روی وزن تر کاهو، وزن خشک کاهو و وزن تر ریشه داشتند. در تیمارهای *Bacillus* gh1 *methylotrophicus*، b1 *Bacillus velezensis* و c11 *Bacillus siamensis* وزن تر کاهو به ترتیب 28/8%، 26/1% و 14/1% و وزن خشک کاهو به‌ترتیب 25/7%، 19/9% و 15/2% نسبت به تیمار شاهد افزایش نشان دادند. یافته‌ها نشان داد با استفاده از باکتری‌های تولیدکننده آنزیم کراتیناز می توان تجزیه پر را افزایش داده و از محصول حاصل به‌عنوان محرک رشد کاهو استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: اسیدآمینه آزاد، خاک، کراتین، محرک رشد

[1] نویسنده مسئول، آدرس: کرج، میدان استاندارد، جاده مشکین‌دشت، بلوار امام خمینی، موسسه تحقیقات خاک و آب.

مقدمه

با افزایش جمعیت طی چند دهه گذشته تولید محصولات کشاورزی نیز رشد داشته است و منجربه حداکثر استفاده از محصولات شیمیایی به‌منظور افزایش بهره‌وری و عملکرد گیاهان شده است که تهدیدی جدی برای سلامت انسان و محیط‌زیست است. به همین دلیل کاهش استفاده از کودهای شیمیایی بزرگ‌ترین چالش امروزه کشاورزان است (باری و همکاران، 2021). استفاده از مواد زائد حیوانی به‌عنوان منابع تجدیدپذیر به‌منظور تولید کود یک گزینه مناسب است (ارخی پچینکو و همکاران، 2005). گروه‌های تحقیقاتی تلاش کرده‌اند با استفاده از محصولات جانبی کشاورزی، دام و طیور، موجبات بازیافت آن‌ها را فراهم نمایند (ردی و همکاران، 2013؛ ردی و یانگ، 2005). پر مرغ مهم‌ترین محصول جانبی صنایع فرآوری طیور در سراسر جهان است (باری و همکاران، 2021). طبق بررسی وزارت کشاورزی ایالات‌متحده، در سال 2020 حدود 100/5 میلیون تن گوشت تولیدشده و درنتیجه بیش از 4/7 میلیون تن پر مرغ در سراسر جهان تولیدشده است (چیو و همکاران، 2020).

در حال حاضر پر با دفن کردن یا سوزاندن دفع می‌شود که منجر به خطرات جدی بهداشتی و آلودگی محیط‌زیست می‌شود (دیدیر و همکاران، 2005). پر مرغ حاوی 90% پروتئین با عنوان کراتین است (اردیاتی، 2019). پروتئین کراتین یک منبع طبیعی از اسیدهای آمینه ضروری و پپتیدها است که می‌تواند در مکمل‌های خوراک دام و به‌عنوان کود مورداستفاده قرار گیرد (ورما و همکاران، 2016). در حال حاضر بازیافت زباله‌های کراتین با استفاده از دمای بالا، فشار زیاد، هیدرولیز اسیدی و قلیایی انجام می‌شود (تیواری و گوپتا، 2012؛ جایالکشمی و همکاران، 2012؛ گوپتا و همکاران، 2013). هزینه بالا، نیاز به مقدار زیاد انرژی و از بین رفتن اسیدهای آمینه ضروری (هرتزوگ و همکاران، 2016) مانند لیزین، متیونین و هیستیدین (آدلیر و لطیف، 2016؛ براندلی و همکاران ، 2010) توجه محققان را به توسعه فن‌آوری‌های جدید برای تجزیه پرها جلب کرده است. بیوتکنولوژی به‌عنوان یک روش جایگزین و امیدوارکننده برای این منظور شناخته‌شده است. پرها توسط ریزجانداران از جمله باکتری‌ها، اکتینومیست‌ها و قارچ‌ها که آنزیم کراتیناز تولید می‌کنند تجزیه می‌شوند. تعدادی از سویه‌های میکروبی با عملکرد تجزیه پر از طریق روش‌های مختلف غربالگری جداسازی شده‌اند (گوپتا و رامنانی، 2006؛ براندلی و همکاران، 2010). ریزجانداران برای محیط زیست اهمیت زیادی دارند و به عنوان بازیافت‌کننده اصلی در محیط عمل می‌کنند. متابولیت‌های اولیه مانند اسیدآمینه، آنزیم‌ها، ویتامین‌ها، اسیدهای آلی و الکل به عنوان مکمل‌های غذایی و همچنین در تولید کالاهای صنعتی از طریق فرآیند تبدیل زیستی استفاده می‌شوند (سینگ و همکاران ، 2017).

بر اساس تحقیقات انجام‌شده سویه *Bacillus pumilus* KHS-1 قادر به تجزیه پر است. تأثیر پر تجزیه‌شده بر رشد گیاه هویج و کلم چینی نشان داد که این محصول می‌تواند به‌عنوان کود استفاده شود (کیم و همکاران، 2005) همچنین پر تجزیه‌شده به‌وسیله باکتری*Streptomyces sampsonii* GS1322 به خاک اضافه شد و تأثیر مثبتی بر جوانه‌زنی بذر گندم داشت (جین و همکاران، 2016). در پژوهش دیگری تأثیر پر تجزیه‌شده توسط سویه *Bacillus pumilus* JYL بر روی گندم موردبررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد ارتفاع بوته، طول ریشه، وزن تازه و وزن خشک نسبت به شاهد افزایش نشان داده است (سان و همکاران، 2021). با مدیریت پایدار ضایعات پر و استفاده از محصول حاصل از تجزیه کراتین به‌عنوان محرک رشد گیاه، انتظارمی‌رود در آینده بتواند جایگزین مناسبی برای کودهای شیمیایی باشد (باری و همکاران، 2021).

کاهو یکی از سبزی‌های با اهمیتی است که به‌طور گسترده کشت می‌شود و به‌عنوان سالاد درسراسر

جهان مصرف می‌شود. کاهو به دلیل عناصرمعدنی، ویتامین‌ها و فولات نقش بسزایی در رژیم غذایی انسان دارد (آموزگار و همکاران، 2017؛ ساموئولین و همکاران، 2009). ایران با سطح زیر کشت 17000 هکتار و تولیدسالانه 570 هزار تن، در رتبه ششم قرار گرفته است (فائو، 2012)؛ بنابراین به‌کارگیری روش‌هایی که باعث افزایش مقدار تولید این محصول شود اهمیت شایانی در روش‌های مدیریتی دارد.

هدف از این تحقیق جداسازی باکتری‌های تولیدکننده آنزیم کراتیناز از محیط خاک‌های مخلوط شده با پر مرغ، تعیین مقدار اسیدآمینه تولیدشده در محیط تجزیه پر و بررسی تأثیر محلول‌پاشی با فرآورده‌های تولیدشده از تجزیه پر به‌عنوان محرک رشد بر عملکرد کاهو بود.

مواد و روش‌ها

جداسازی باکتری‌ها از خاک مخلوط با پر

تعداد 29 نمونه خاک از عمق صفر تا سی سانتی متری مزارع کشاورزی مازندران، آذربایجان غربی، سمنان، خراسان، بوشهر، چهارمحال و بختیاری، فارس، اصفهان، خوزستان، هرمزگان، کرمان، کرمانشاه، آذربایجان شرقی، گلستان و لرستان جمع‌آوری شد و سپس هوا خشک گردید. مقدار 100 گرم از هر یک از خاک‌ها با پنج گرم پر مرغ مخلوط گردید و پس از تنظیم رطوبت همه نمونه‌ها به یک‌میزان، درون انکوباتور در دمای 30 درجه سلسیوس به مدت سه هفته نگهداری شدند. به‌منظور جداسازی اولیه با استفاده از روش رقیق‌سازی سریالی، سریال رقت نمونه‌ها به محیط کشت اختصاصی پودر پر جامد[1](FMA) انتقال داده شد. پر به‌عنوان تنها منبع کربن و نیتروژن در محیط کشت، رشد ریزجاندارانی که در تجزیه کراتین ناتوان هستند را محدود می‌کند (بوز و همکاران، 2014) محیط کشت اختصاصی پودر پر جامد حاوی 10 گرم در لیتر پرآسیاب شده، 0/5 گرم در لیتر NaCl، 0/3 گرم در لیتر K_2HPO_4، 0/4 گرم در لیتر KH_2PO_4 و 15 گرم در لیتر آگار بود (باخ و همکاران، 2011). پتری‌ها به مدت هفت روز در انکوباتور در دمای 30 درجه سلسیوس نگهداری شدند. سپس تک کلنی‌ها انتخاب، جداسازی و خالص شدند.

بررسی توان تجزیه پر توسط جدایه‌ها

به‌منظور بررسی توان تجزیه پر توسط جدایه‌ها ابتدا محیط کشت حاوی 0/3 گرم در لیتر K_2HPO_4، 0/4 گرم در لیتر KH_2PO_4، 0/5 گرم در لیتر NaCl و 1% پر مرغ تهیه گردید و PH برابر 7/5 تنظیم شد و سپس اتوکلاو گردید. پس از 48 ساعت رشد جدایه‌ها در محیط نوترینت براس، 2% مایع تلقیح به محیط کشت حاوی پر اضافه شد و در شیکرانکوباتور در دمای 30 درجه سلسیوس و 150 دور در دقیقه قرار گرفتند. پس از هفت روز محیط‌های کشت از کاغذ صافی عبور داده شد و پرهای محیط جدا شدند. سپس درون آون در دمای 50 درجه سلسیوس قرار گرفتند و پس از خشک شدن، نمونه‌ها وزن شد و تفاوت بین وزن پر باقی مانده با نمونه شاهد به‌عنوان معیار تجزیه پر استفاده شد (سریواستاوا و همکاران، 2011). جدایه‌هایی که قادر به تجزیه کامل پر بودند به‌عنوان نمونه‌های برتر انتخاب شدند و محیط صاف‌شده آن‌ها در دمای چهار درجه سلسیوس نگهداری شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کراتیناز جدایه‌ها

به‌منظور اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کراتیناز، محیط صاف‌شده با سرعت 4000 دور در دقیقه به مدت پنج دقیقه سانتریفیوژ گردید و مایع رویی به‌عنوان منبع آنزیم خام استفاده شد. سپس 0/2 میلی لیتر از منبع آنزیم خام با 20 میلی‌گرم پرآسیاب شده و 3/8 میلی‌لیتر بافر Tric-Hcl 100 میلی مولار (pH7/8) مخلوط گردید و در انکوباتور قرار داده شد (دمای 37 درجه سلسیوس) پس از یک ساعت لوله‌ها درون آب سرد–یخ به مدت 10 دقیقه به‌منظور توقف واکنش قرار گرفتند و سپس محتویات لوله‌ها از فیلتر عبور داده شد و جذب آن‌ها در 280 نانومتر اندازه‌گیری شد. یک واحد کراتیناز عبارت است از

[1]. Feather meal agar

مقدار آنزیمی که سبب افزایش جذب به میزان 1/0 در طول‌موج 280 نانومتر تحت شرایط آزمایش شود. ضمناً نمونه شاهد با روش مشابه تهیه گردید به‌استثناء اینکه به‌جای محیط صاف‌شده همان حجم بافر اضافه شد (انبو و همکاران، 2007).

اندازه‌گیری میزان نیتروژن آمونیاکی در محیط تکثیر جدایه‌ها

محیط کشت صاف‌شده نمونه‌های منتخب که قادر به تجزیه پر در کمترین زمان بودند به‌منظور اندازه‌گیری نیتروژن آمونیاکی، با سرعت 10000 دور در دقیقه به مدت 10 دقیقه در دمای چهار درجه سلسیوس سانتریفیوژ گردید سپس در دستگاه KJELTECAUTO (1030 Analyzer) قرار گرفتند و پس از قرائت دستگاه، درصد نیتروژن آمونیاکی آن‌ها محاسبه گردید (امامی، 1375).

بررسی میزان اسیدهای آمینه در محیط تکثیر جدایه‌ها

به‌منظور بررسی مقدار اسیدآمینه تولیدشده پس از تجزیه پر، محیط کشت صاف‌شده حاوی 1% پر با سرعت 10000 دور در دقیقه به مدت 10 دقیقه در دمای چهار درجه سلسیوس سانتریفیوژ گردید و اسیدهای آمینه آزاد ماده رویی با روش HPLC موردبررسی قرارگرفت (گونزالس-کاسترو و همکاران، 1997؛ چکا-مورنو و همکاران، 2008).

بررسی مقدار بهینه پر در محیط کشت

جدایه‌هایی که بالاترین مقدار اسیدآمینه آزاد در محیط کشت 1% پر آن‌ها مشاهده شد جهت تعیین مقدار بهینه پر به‌منظور تولید اسیدآمینه بیشتر در واحد حجم، به محیط‌های کشت حاوی 2% و 3% پر انتقال داده شدند. پس از تجزیه کامل پر مقدار اسیدآمینه آزاد محیط به روش HPLC اندازه‌گیری شد (گونزالس-کاسترو و همکاران، 1997؛ چکا- مورنو و همکاران، 2008).

شناسایی مولکولی جدایه‌های منتخب

به‌منظور استخراج DNA ژنومی باکتری‌ها از یک کشت 24 ساعته بر اساس پروتکل کیت سینا ژن (CinnaGen Co.Ltd.Iran) استفاده شد. برای تکثیر ناحیه ژنی 16S rDNA از آغازگرهای عمومی 27F و 1492Rاستفاده گردید. تکثیر ناحیه ژنی 16S rDNA طبق برنامه زمانی و دمایی مشخص انجام شد و محصول PCR حاصل از تکثیر ناحیه ژنی 16S rDNA از ژل آگارز یک درصد در بافر TBE(1X) عبور داده شد. به‌منظور تعیین توالی محصول حاصل به شرکت Bioneer کره جنوبی ارسال گردید. پس از دریافت نتایج، توالی نوکلئوتیدی سویه‌ها توسط نرم‌افزار Vector NTI اصلاح‌شده و یک توالی هم‌پوشان برای هر سویه به دست آمد. سپس این توالی‌های هم‌پوشان در پایگاه NCBI با استفاده از Blastn با توالی‌های موجود مقایسه شدند (ژیانگ و همکاران، 2006). در پایان و پس از شناسایی سویه‌های باکتریایی جداسازی شده، توالی ژن 16S rDNA همه آن‌ها در GenBank (http://www. ncbi. nlm. nih. gov/ Genbank) ثبت و شماره دسترسی برای هر یک از آن‌ها به دست آمد.

بررسی تأثیر محلول حاصل از تجزیه پر مرغ بر رشد کاهو

این پژوهش به‌صورت یک آزمایش گلدانی در گلخانه موسسه تحقیقات خاک و آب کرج به اجرا درآمد. نشاهای کاهو رقم سیاه مهر به گلدان‌های حاوی مخلوط کوکوپیت و پرلیت (نسبت چهار به یک) انتقال داده شد. تأثیر محلول حاصل از تجزیه کامل 2% پر در محیط کشت، توسط سه سویه *B. methylotrophicus* gh1، *B. velezensis* b1 و *B. siamensis* c11 بر روی گیاهان موردبررسی قرار گرفت. تیمارهای آزمایش شامل محلول‌پاشی با سه محلول حاصل از تجزیه پر (gh1، c11، b1) و آب مقطر به‌عنوان شاهد در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار انجام شد. محیط کشت حاوی 2% پر تجزیه شده توسط سویه ها با سرعت 10000 دور در دقیقه به مدت 10 دقیقه در دمای چهار درجه سلسیوس سانتریفیوژ گردید و محلول رویی در سه مرحله به فاصله 10 روز بر روی گیاهان اسپری شد. مرحله اول

محلول‌پاشی پس از انتقال نشاها به گلدان‌ها و محلول‌پاشی‌های بعدی هر 10 روز یک‌بار (جمعاً سه بار) تکرار گردید. در تهیه محلول‌غذایی با اصلاحاتی در مقدار، از فرمول ارائه‌شده توسط ون زینرنبیکر (1986) استفاده شد (جدول 1). برداشت پس از 30 روز انجام شد .اندام‌هوایی از ریشه جدا گردید و وزن تر گیاه اندازه‌گیری شد. اندام‌هوایی و ریشه به مدت 48 ساعت داخل آون در دمای 70 درجه سلسیوس قرار گرفتند و پس از خشک شدن، وزن خشک اندام‌هوایی و ریشه گیاهان اندازه‌گیری شد.

جدول 1- غلظت عناصر در محلول‌غذایی (گرم در 100 لیتر آب)

نیترات پتاسیم	نیترات کلسیم	نیترات آمونیوم	آهن	سولفات پتاسیم	سولفات منیزیم	فسفات مونو پتایسم	عناصر میکرو
17/5	42	2/5	0/6	15	19	11	0/5

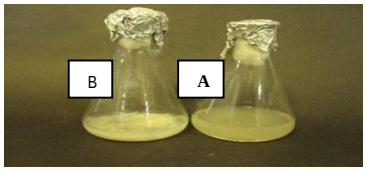
تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌ها

تجزیه‌وتحلیل‌های آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS9.1 و مقایسه میانگین‌ها بر مبنای آزمون LSD در سطح احتمال 5 درصد انجام شد.

نتایج

جداسازی و غربالگری باکتری‌های تجزیه‌کننده پر

در مرحله اول، تعداد 31 جدایه باکتریایی باقابلیت رشد بر روی محیط کشت اختصاصی پودر پر جامد (FMA) جداسازی و خالص شدند. در مرحله دوم جهت غربال جدایه‌های برتر بر اساس قابلیت تجزیه کامل پر در کوتاه‌ترین زمان از محیط کشت مایع حاوی پر استفاده شد. کاهش وزن پر شاخص انتخاب سویه برتر بود که پس از وزن کردن پرها منتج به شناسایی هشت جدایه به‌عنوان نمونه‌های منتخب که قادر به تجزیه کامل پر در هفت روز بودند شد (شکل 1).



شکل 1-تجزیه پر پس از هفت روز. A، پر بصورت کامل تجزیه‌شده است. B، نمونه شاهد

شناسایی مولکولی جدایه‌های برتر براساس توالی 16S rDNA

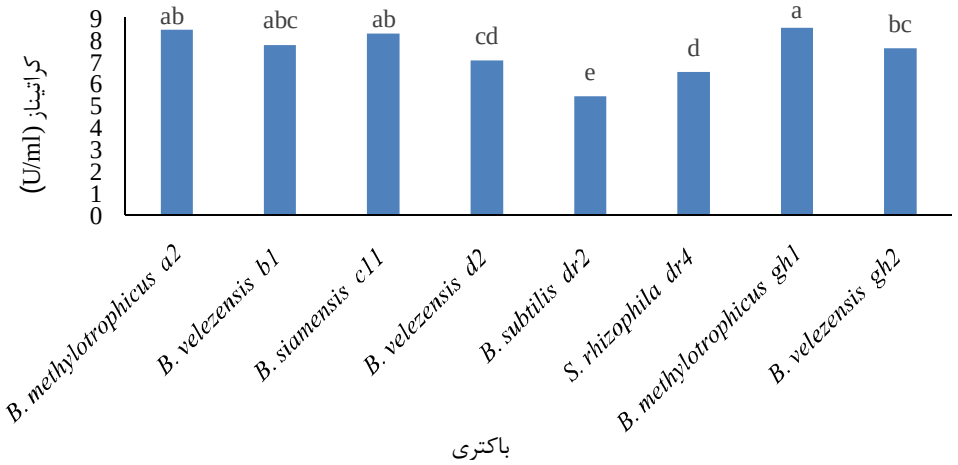
با توالی یابی فرآورده PCR مربوط به تکثیر ژن 16S rDNA، هشت سویه جداسازی و شناسایی شدند. توالی‌های 16S rDNA سویه‌های برتر در بانک اطلاعاتی NCBI با شماره دسترسی که در جدول 2 به آنها اشاره شده، ثبت شد.

جدول 2- شناسایی مولکولی سویه‌های برتر بر اساس توالی 16S rDNA و شماره دسترسی آن‌ها در بانک اطلاعاتی NCBI

نام سویه	شناسایی سویه	درصد تشابه	شماره دسترسی
gh2	*Bacillus velezensis*	99	MT229223
d2	*Bacillus velezensis*	99	MT229225
b1	*Bacillus velezensis*	99	MT229224
c11	*Bacillus siamensis*	99	MT229226
dr2	*Bacillus subtilis*	99	MT229229
dr4	*Stenotrophomonas rhizophila*	99	MT229230
gh1	*Bacillus methylotrophicus*	99	MT229227
a2	*Bacillus methylotrophicus*	99	MT229228

فعالیت آنزیم کراتیناز

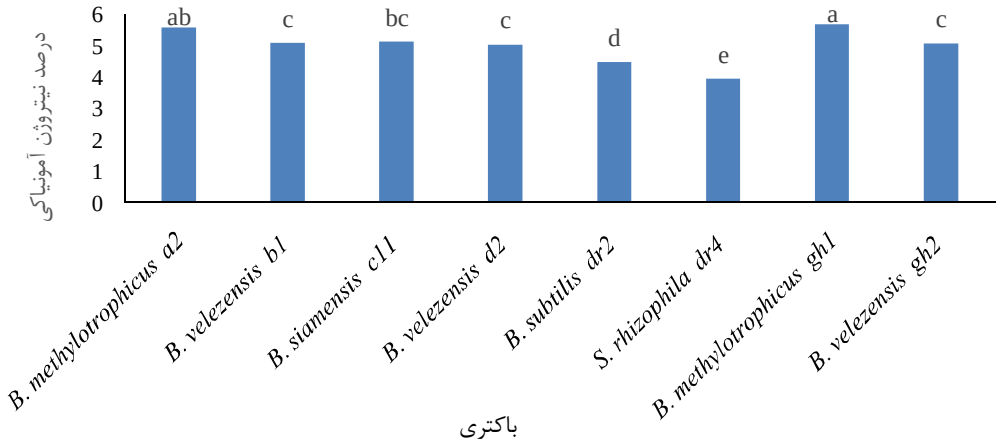
نتایج حاصل از ارزیابی فعالیت آنزیم کراتیناز پس از هفت روز در بین باکتری‌های موردبررسی، متفاوت بود. حداکثر فعالیت آنزیم کراتیناز در سویه *Bacillus methylotrophicus* gh1 (8/56 U/ml) مشاهده شد که با سویه‌های *Bacillus methylotrophicus* a2، *Bacillus siamensis* c11 و *Bacillus velezensis* b1 تفاوت معنی‌داری نداشتند. کمترین فعالیت این آنزیم نیز در سویه *Bacillus subtilis* dr2 به میزان 5/42 U/ml به دست آمد (شکل 2).



شکل 2- فعالیت آنزیم کراتیناز باکتری‌ها

میزان نیتروژن آمونیاکی

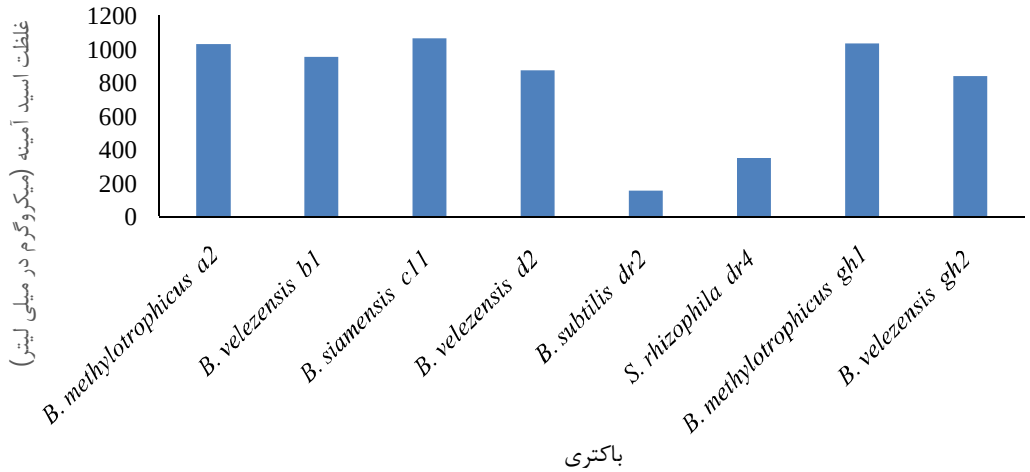
نیتروژن آمونیاکی محیط حاوی پر تجزیه‌شده بین 3/96 تا 5/69 درصد بود. در محیط کشت دو سویه *B. methylotrophicus* gh1 و *B. methylotrophicus* a2 بیشترین درصد نیتروژن آمونیاکی مشاهده شد و کمترین مقدار در محیط کشت سویه *Stenotrophomonas rhizophila* dr4 بود که با سایر سویه‌ها تفاوت معنی‌داری داشت (شکل 3).



شکل 3- درصد نیتروژن آمونیاکی محیط حاوی پر تجزیه‌شده به‌وسیله باکتری‌ها

میزان اسیدهای آمینه آزاد

مقدار اسیدآمینه آزاد در محیط کشت حاوی 1% پرتجزیه‌شده توسط باکتری‌های منتخب به تفکیک مشخص گردید. محیط تجزیه پر حاوی لیزین، ترئونین، آرژنین، متیونین، فنیل آلانین، والین، لوسین، هیستیدین، ایزولوسین، پرولین، گلیسین، آلانین، سرین، سیستئین، آسپاراژین، گلوتامین و تیروزین بود. در بین نمونه‌ها حداکثر غلظت اسیدآمینه آزاد در محیط پر تجزیه‌شده توسط سویه *B. siamensis* c11 (1065 µg/ml) مشاهده شده و سپس سه سویه *B. methylotrophicus* gh1 (1032 µg/ml)، *B. methylotrophicus* a2 (1027µg/ml) و *B. velezensis* b1 (954 µg/ml) در رتبه بعدی قرار گرفتند. کمترین مقدار اسیدآمینه در محیط کشت سویه *B. subtilis* dr2 (155 µg/ml) مشاهده شد (شکل 4).

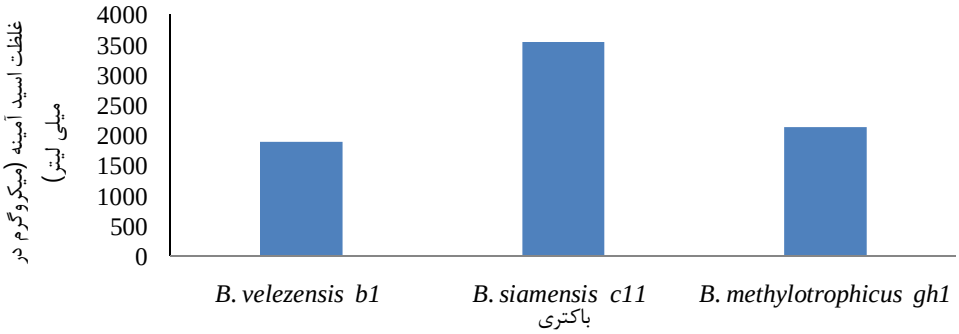


شکل 4- اسیدهای آمینه آزاد در محیط کشت حاوی 1% پر

مقدار بهینه پر در محیط کشت

بررسی محیط‌های کشت حاوی 2% و 3% پر پس از هفت روز نشان داد هر سه سویه *B. siamensis* c11، *B. methylotrophicus* gh1 و *B. velezensis* b1 در محیط کشت حاوی 2% پر عملکرد خوبی داشتند و قادر به تجزیه کامل پرهای بودند (شکل 5) درحالی‌که عملکرد

مناسبی در محیط 3% پر مشاهده نشد و سویه‌ها توانایی تجزیه پرها را بطور کامل نداشتند. در محیط کشت حاوی 2% پر بالاترین مقدار اسیدآمینه در محیط کشت سویه *B. siamensis* c11 (3544 µg/ml) مشاهده شد که نسبت به محیط کشت حاوی 1% پر 3/3 برابر شده بود و مقدار اسیدآمینه در محیط کشت سویه‌های *B. methylotrophicus* gh1 (2131 µg/ml) و *B. velezensis* b1 (1883 µg/ml) حدوداً 2 برابر شد. نتایج نشان داد مقدار بهینه پر در محیط کشت جهت تولید اسید آمینه معادل 2% پر است.



شکل 5- اسیدهای آمینه آزاد در محیط کشت حاوی 2% پر

تأثیر محلول حاصل از تجزیه پر مرغ بر رشد کاهو

نتایج حاصل از تجزیه واریانس (جدول 3) نشان می‌دهد تأثیر محلول حاصل از تجزیه پر بر روی وزن تر کاهو در سطح یک درصد معنی‌دار است. مقایسه میانگین نشان داد وزن تر کاهو درتیمارهای gh1، b1 و c11 نسبت به تیمار شاهد به ترتیب 28/8%، 26/1% و 14/1% افزایش داشت (جدول 4). همچنین وزن خشک کاهو در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول 3). وزن خشک کاهو درتیمارهای gh1، b1 و c11 نسبت به تیمار شاهد به ترتیب 25/7%، 19/9% و 15/2% افزایش نشان داد (جدول 4). بر اساس نتایج به‌دست‌آمده وزن تر ریشه در سطح یک درصد معنی‌دار و وزن خشک ریشه تفاوت معنی‌داری نداشت.

جدول 3- جدول آنالیز واریانس صفات اندازه‌گیری شده

منبع تغییرات s.o.v	وزن تر کاهو	وزن خشک کاهو	وزن تر ریشه	وزن خشک ریشه
محلول‌پاشی	3255**	3/31**	0/917**	0/007ns
خطا	20/1	0/149	0/015	0/003
ضریب تغییرات	1/77	4/05	0/51	2/06

**: معنی‌دار در سطح 1 درصد، *: معنی‌دار در سطح 5 درصد و ns: معنی‌دار نیست

جدول 4- جدول مقایسه میانگین تیمارهای اسیدآمینه حاصل از تجزیه پر بر صفات اندازه‌گیری شده

محصول حاصل از تجزیه پر	وزن تر کاهو	وزن خشک کاهو	وزن تر ریشه	وزن خشک ریشه
	گرم در گلدان			
gh1	279a	10/4a	25/0a	3/08ab
b1	273a	9/92ab	24/9a	3/09a
C11	247b	9/53b	24/3b	3/05ab
blank	216 c	8/27c	24/0 c	2/99ab

میانگین‌ها با حداقل یک حرف مشترک در هر ستون فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال 5% براساس آزمون LSD هستند

بحث

در این مطالعه باکتری‌های تولیدکننده آنزیم کراتیناز به‌منظور تجزیه پر مرغ از خاک‌های مخلوط با پر جداسازی و شناسایی شدند. بر اساس نتایج توالی‌یابی حاصل از تکثیر ژن 16S rDNA، اکثر باکتری‌ها متعلق به جنس باسیلوس شامل *B. velezensis*، *B. methylotrophicus*، *B. subtilis*، *B. siamensis* بودند. در تحقیقات انجام‌شده گونه‌های مختلف باسیلوس مانند *Bacillus licheniformis* RG1 (رامانی و همکاران، 2005)، *Bacillus subtilis* PF1 (بهانگ و همکاران، 2016) *Bacillus pumilis* KHS-1 (کیم و همکاران، 2005) و *Bacillus amyloliquefaciens* 6B (بوز و همکاران، 2014) به‌عنوان باکتری‌های تجزیه‌کننده پر معرفی‌شده‌اند. براساس اطلاعات ما و بررسی هایی که انجام دادیم در حال حاضر به نظر می‌رسد تاکنون گزارشی مبنی بر فعالیت *Bacillus siamensis* و *Bacillus methylotrophicus* در تجزیه پر ارائه نشده است؛ بنابراین در این مطالعه به‌عنوان سویه‌های جدید با فعالیت کراتینولیتیک معرفی می‌شوند.

تجزیه پر توسط هشت سویه منتخب، در pH خنثی (pH 7.5) و 30 درجه سلسیوس مشاهده شد. از دیدگاه بیوتکنولوژی قابلیت تجزیه پر توسط این سویه‌ها در pH خنثی و دمای متوسط حائز اهمیت است، زیرا ممکن است هضم پر در مقادیر قلیایی بالاتر (pH >9) باعث از بین رفتن برخی از اسیدهای آمینه ضروری گردد (براندلی، 2008). این سویه‌ها پر را در هفت روز به‌طور کامل تجزیه کردند، درحالی‌که سویه *Bacillus licheniformis* PWD-1 طی 10 روز پر مرغ را تجزیه نمود (ویلیامز و همکاران، 1990). مشابه این مطالعه، سویه *Bacillus megaterium* F7-1 قادر به تجزیه کامل پر مرغ پس از هفت روز از تلقیح بود (پارک و سون، 2009). در این مطالعه باکتری‌های *B. methylotrophicus* gh1، *B. methylotrophicus* a2، *B. siamensis* c11 و *B. velezensis* b1 فعالیت کراتینازی بالاتری نسبت به چهار سویه دیگر داشتند. همچنین مشاهده شد مقدار اسیدآمینه در محیط کشت این چهار سویه بیشتر است. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده می‌توان استنباط کرد که هرچه باکتری از توانایی بالاتری برای تولید آنزیم کراتیناز برخوردار باشد مقدار اسیدآمینه بیشتری به دلیل افزایش تجزیه پر تولید خواهد کرد. استفاده از ریزجانداران موجب سهولت و کاهش هزینه‌های تولید آنزیم می‌گردد. این امر موردتوجه سرمایه‌گذاران بخش کشاورزی در سطح جهان قرارگرفته است (گوراو و جاداو، 2013).

هدف اصلی از بازیافت پر به کمک روش‌های بیوتکنولوژی، تبدیل ضایعات پر به پروتئین قابل‌هضم و اسیدهای آمینه است (جیاتیلاکان و همکاران، 2012). لذا به‌منظور تولید اسیدآمینه بیشتر در واحد حجم، سه سویه مختلف باکتری که بالاترین مقدار اسیدآمینه کل در محیط کشت 1% پر آن‌ها مشاهده‌شده بود به محیط هایی که پر در آن‌ها دو و سه برابر شده بود انتقال داده شدند. نتایج نشان داد در شرایطی که پر 2 برابر شد ازنظر مقدار اسیدهای آمینه کل در محیط کشت، شاهد افزایش حدوداً دو تا سه برابر میزان اسیدآمینه کل در محیط سویه‌های *B. methylotrophicus* gh1، *B. velezensis* b1 و *B. siamensis* c11 نسبت به محیط کشت1% پر بودیم. ازاین‌رو سویه‌هایی که قادر به تجزیه پروتئین پر هستند کاندید مناسبی برای تولید اسیدهای آمینه از زباله‌های پر می‌باشند (کشتری و همکاران، 2019). در محیطی که پرها 3 برابر شدند، سویه‌ها قادر به تجزیه کامل پر نبودند. ازآنجایی‌که آنزیم کراتیناز یک آنزیم القایی است افزایش درصد مقدار پر می‌تواند باعث افزایش فعالیت آنزیم و تجزیه بهتر پر گردد ولی از یک غلظتی به بالا به دلیل اختلال در هوادهی و افزایش ویسکوزیته محیط اثر معکوس دارد که به‌نوبه خود رشد میکروبی و تجزیه پرها را کاهش می‌دهد. در پژوهشی مشابه به‌منظور تعیین دوز بهینه پر، تأثیر سویه *Stenotrophomona smaltophilia* DHHJ بر تجزیه پر در محیط کشت حاوی مقادیر 60،

70، 80 و 90 گرم پر در 3 لیتر محیط کشت مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد تجزیه 90 گرم پر توسط باکتری به‌خوبی انجام نشد (کائو و همکاران، 2012).

پرهای تجزیه‌شده اسیدهای آمینه ضروری تولید می‌کنند که می‌توانند به‌عنوان پیش ماده ترکیبات تقویت‌کننده رشد گیاه عمل کنند (رای و موکرجی، 2015). به‌منظور بررسی تأثیر محصول حاصل از تجزیه پر بر عملکرد کاهو از سه محلول با بیشترین مقدار اسیدآمینه استفاده گردید. نتایج نشان داد وزن تر کاهو درتیمارهای gh1، b1 و c11 نسبت به تیمار شاهد افزایش داشت. این تأثیر مثبت در افزایش رشد به این دلیل است که اسیدهای آمینه به‌عنوان محرک‌های زیستی باعث رشد رویشی، جذب عناصر غذایی در گیاهان، تحمل تنش و درنهایت منجربه افزایش عملکرد محصول می‌شوند (ورنییری، 2006). وزن خشک کاهو درتیمارهای gh1، b1 و c11 نسبت به تیمار شاهد افزایش داشت. تحقیقات نشان داده است که تأثیر اسیدهای آمینه بر گیاهان بستگی به ارقام گیاهی و نوع اسیدهای آمینه دارد (لیو و همکاران، 2008؛ هواجینگ و همکاران، 2007؛ مبینی و همکاران، 2014). نتایج مشابهی توسط سایر محققان در مطالعات بر روی گیاهان گزارش‌شده است. تأثیر سویه باکتری *S. maltophilia* DHHJ بر تجزیه پر مورد ارزیابی قرار گرفت. پس از تجزیه پر محلول حاصل به‌عنوان کود برگ بر روی کلم چینی اسپری شد. پس از 30 روز این گیاهان نسبت به گیاهان شاهد رشد قابل‌ملاحظه‌ای داشتند (کائو و همکاران، 2012). در پژوهشی از سویه *Chryseobacterium* sp. RBT به‌منظور تجزیه پر استفاده شد. سپس تأثیر محلول حاصل از تجزیه پر به‌عنوان منبع مواد مغذی آلی برای گیاه موز موردبررسی قرار گرفت که باعث افزایش پتانسیل آنتی‌اکسیدانی میوه موز شد (گوراو و جاداو، 2013). مطالعات میدانی در خصوص استفاده از هیدرولیزات پر با سویه *Chryseobacterium* sp. RBT به‌عنوان تقویت‌کننده برای دو گیاه brinjal و فلفل قرمز انجام شد. نتایج آزمایش‌ها، گلدهی زودرس، بهبود عملکرد محصول و تأثیر مثبت بر رشد و نمو گیاهان را نشان داد. علاوه بر این، کیفیت غذایی این دو گیاه ازنظر پروتئین، اسیدهای آمینه، فلاونوئیدها و آنتی‌اکسیدان افزایش یافت (گوراو و همکاران، 2020). در همین راستا، از هیدرولیز پر می‌توان به‌عنوان یک کود (رای و موکرجی، 2015؛ کشتری و همکاران، 2019)، باهدف بهبود عملکرد گیاه استفاده نمود (واسیلوا-تونکووا و همکاران، 2009).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج حاصل از این تحقیق بیانگر این است که محصولات تولیدشده از تجزیه پر با باکتری‌های *Bacillus methylotrophicus* gh1، *Bacillus siamensis* c11 و *Bacillus velezensis* b1 تأثیر مثبتی بر رشد کاهو داشتند. یافته‌ها نشان داد که این روش نقش دوگانه‌ای بازی خواهد کرد. شیوه‌ای مقرون به‌صرفه که می‌تواند زباله‌های مقاوم را کاهش داده و هم از مواد اولیه ارزان و تجدیدپذیر به‌عنوان تقویت‌کننده زیستی برای کاهش استفاده از مواد شیمیایی به‌منظور افزایش عملکرد کمی و کیفی گیاهان استفاده کرد. این محصولات از منظر صنعتی بسیار امیدوارکننده است و راه را برای تحقیقات بیشتر و تولید تجاری در مقیاس بزرگ باز می‌کند.

تشکر و قدردانی

این پژوهش در موسسه تحقیقات خاک و آب کرج انجام شده است. بدین‌وسیله از ریاست محترم موسسه آقای دکتر اسدی، رئیس آزمایشگاه بیولوژی آقای دکتر رجالی و همچنین آقای دکتر جهاندیده، آقای دکتر دولت‌آباد و کارشناسان محترم آزمایشگاه بیولوژی موسسه تحقیقات خاک و آب کمال تشکر و قدردانی می‌گردد.

فهرست منابع:

1. امامی، ع. 1375. روش‌های تجزیه گیاه. موسسه تحقیقات آب و خاک. نشریه شماره 982. 8-90.
2. Adelere, I.A. and Lateef, A. 2016. Keratinases: emerging trends in production and applications as novel multifunctional biocatalysts. Kuwait Journal of Science 43.
3. Amoozgar, A., Mohammadi, A. and Sabzalian, M.R. 2017.Impact of light-emitting diode irradiation on photosynthesis, phytochemical composition and mineral element content of lettuce cv. Grizzly. Photosynthetica 55:85-95.
4. Anbu, P., Gopinath, S.C.B., Hilda, A., Lakshmipriya, T. and Annadurai, G. 2007. Optimization of extra cellular keratinase production by poultry farm isolate *Scopulariopsis brevicaulis*. Bioresource Technology 98:1298-1303.
5. Ardyati, T. 2019, December. Screening of Keratinolytic Fungi for Biodegradation Agent of Keratin from Chicken Feather Waste. In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science (Vol. 391, No. 1, p. 012027). IOP Publishing.
6. Arkhipchenko, I.A., Salkinoja-Salonen, M.S., Karyakina, J.N. and Tsitko, I. 2005. Study of three fertilizers produced from farm waste. Applied Soil Ecology 30:126-132.
7. Bach, E., Daroit, D.J., Corrêa, A.P.F. and Brandelli, A. 2011. Production and properties of keratinolytic proteases from three novel Gram-negative feather-degrading bacteria isolated from Brazilian soils. Biodegradation *22*:1191-1201.
8. Bhange, K., Chaturvedi, V. and Bhatt, R. 2016. Ameliorating effects of chicken feathers in plant growth promotion activity by a keratinolytic strain of *Bacillus subtilis* PF1. Bioresources and Bioprocessing 3:1-10.
9. Bhari, R., Kaur, M. and Singh, R.S. 2021. Chicken feather waste hydrolysate as a superior biofertilizer in agroindustry. Current Microbiology 1-19.
10. Bose, A., Pathan, S., Pathak, K. and Keharia, H. 2014. Keratinolytic protease production by *Bacillus amyloliquefaciens* 6B using feather meal as substrate and application of feather hydrolysate as organic nitrogen input for agricultural soil. Waste and Biomass Valorization 5:595-605.
11. Brandelli, A., Daroit, D.J. and Riffel, A. 2010. Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications. Applied Microbiology and Biotechnology 85:1735-1750.
12. Brandelli, A., 2008. Bacterial keratinases: useful enzymes for bioprocessing agroindustrial wastes and beyond. Food and Bioprocess Technology 1:105-116.
13. Cao, Z.J., Lu, D., Luo, L.S., Deng, Y.X., Bian, Y.G., Zhang, X.Q. and Zhou, M.H. 2012. Composition analysis and application of degradation products of whole feathers through a large scale of fermentation. Environmental Science and Pollution Research 19:2690-2696.
14. Checa-Moreno, R., Manzano, E., Mirón, G. and Capitán-Vallvey, L.F. 2008. Revisitation of the phenylisothiocyanate-derivatives procedure for amino acid determination by HPLC-UV. Journal of Separation Science 31: 3817-3828.
15. Deydier, E., Guilet, R., Sarda, S. and Sharrock, P. 2005. Physical and chemical characterisation of crude meat and bone meal combustion residue:“waste or raw material?”. Journal of Hazardous Materials 121:141-148.
16. FAO. 2012. Lettuce and chicory production quantity. Available online at http://faosta3.fao.org/ home/index.html≠download .Accessed 2 October 2016.
17. González-Castro, M.J., López-Hernández, J., Simal-Lozano, J. and Oruña-Concha, M.J. 1997. Determination of amino acids in green beans by derivatization with phenylisothiocianate and high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. Journal of Chromatographic Science 35:181-185.

18. Gupta, R., Sharma, R. and Beg, Q.K. 2013. Revisiting microbial keratinases: next generation proteases for sustainable biotechnology. Critical Reviews in Biotechnology 33:216-228.
19. Gupta, R. and Ramnani, P. 2006. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. Applied Microbiology and Biotechnology 70:21-33.
20. Gurav, R., Nalavade, V., Aware, C., Vyavahare, G., Bhatia, S.K., Yang, Y.H., Bapat, V. and Jadhav, J. 2020. Microbial degradation of poultry feather biomass in a constructed bioreactor and application of hydrolysate as bioenhancer to vegetable crops. Environmental Science and Pollution Research 27:2027-2035.
21. Gurav, R.G. and Jadhav, J.P. 2013. A novel source of biofertilizer from feather biomass for banana cultivation. Environmental Science and Pollution Research 20:4532-4539.
22. Herzog, B., Overy, D.P., Haltli, B. and Kerr, R.G. 2016. Discovery of keratinases using bacteria isolated from marine environments. Systematic and Applied Microbiology 39:49-57.
23. Hua-Jing, W.A.N.G., Liang-Huan, W.U., Min-Yan, W.A.N.G., Yuan-Hong, Z.H.U., Qin-Nan, T.A.O. and Zhang, F.S. 2007. Effects of amino acids replacing nitrate on growth, nitrate accumulation, and macroelement concentrations in pak-choi (Brassica chinensis L). Pedosphere 17:595-600.
24. Jain, R., Jain, A., Rawat, N., Nair, M. and Gumashta, R. 2016. Feather hydrolysate from Streptomyces sampsonii GS 1322: A potential low cost soil amendment. Journal of Bioscience and Bioengineering 121:672-677.
25. Jayalakshmi, T., Krishnamoorthy, P., Kumar, G.R., Sivamani, P. and Lakshmi, C.A. 2012. Application of pure keratinase on keratinous fibers to identify the keratinolytic activity. Journal Chem Pharm Research 4:3229-3233.
26. Jayathilakan, K., Sultana, K., Radhakrishna, K. and Bawa, A.S. 2012. Utilization of byproducts and waste materials from meat, poultry and fish processing industries: a review. Journal of Food Science and Technology 49:278-293.
27. Jiang, H., Dong, H., Zhang, G., Yu, B., Chapman, L.R. and Fields, M.W. 2006. Microbial diversity in water and sediment of Lake Chaka, an athalassohaline lake in northwestern China. Applied and Environmental Microbiology 72:3832-3845.
28. Kim, J.M., Choi, Y.M. and Suh, H.J. 2005. Preparation of feather digests as fertilizer with *Bacillus pumilis* KHS-1. Journal of Microbiology and Biotechnology 15:472-476.
29. Kshetri, P., Roy, S.S., Sharma, S.K., Singh, T.S., Ansari, M.A., Prakash, N. and Ngachan, S.V. 2019. Transforming chicken feather waste into feather protein hydrolysate using a newly isolated multifaceted keratinolytic bacterium *Chryseobacterium sediminis* RCM-SSR-7. Waste and Biomass Valorization 10:1-11.
30. Liu, X.Q., Chen, H.Y., Ni, Q.X. and Kyu, S.L. 2008. Evaluation of the role of mixed amino acids in nitrate uptake and assimilation in leafy radish by using 15N-labeled nitrate. Agricultural Sciences in China 7:1196-1202.
31. Mobini, M., Khoshgoftarmanesh, A.H. and Ghasemi, S. 2014. The effect of partial replacement of nitrate with arginine, histidine, and a mixture of amino acids extracted from blood powder on yield and nitrate accumulation in onion bulb. Scientia Horticulturae 176:232-237.
32. Park, G.T. and Son, H.J. 2009. Keratinolytic activity of *Bacillus megaterium* F7-1, a feather-degrading mesophilic bacterium. Microbiological Research 164:478-485.
33. Qiu, J., Wilkens, C., Barrett, K. and Meyer, A.S. 2020. Microbial enzymes catalyzing keratin degradation: Classification, structure, function. Biotechnology Advances, 44, p.107607.

34. Rai, S.K. and Mukherjee, A.K. 2015. Optimization for production of liquid nitrogen fertilizer from the degradation of chicken feather by iron-oxide (Fe3O4) magnetic nanoparticles coupled β-keratinase. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology 4:632-644.
35. Ramnani, P., Singh, R. and Gupta, R. 2005. Keratinolytic potential of *Bacillus licheniformis* RG1: structural and biochemical mechanism of feather degradation. Canadian Journal of Microbiology 51:191-196.
36. Reddy, N., Jiang, Q., Jin, E., Shi, Z., Hou, X. and Yang, Y. 2013. Bio-thermoplastics from grafted chicken feathers for potential biomedical applications. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 110:51-58.
37. Reddy, N. and Yang, Y. 2005. Biofibers from agricultural byproducts for industrial applications. Trends in Biotechnology 23:22-27.
38. Samuolienė, G., Urbonavičiūtė, A., Duchovskis, P., Bliznikas, Z., Vitta, P. and Žukauskas, A. 2009. Decrease in nitrate concentration in leafy vegetables under a solid-state illuminator. Hort Science 44:1857-1860.
39. Singh, R., Kumar, M., Mittal, A. and Mehta, P.K. 2017. Microbial metabolites in nutrition, healthcare and agriculture. 3 Biotech, 7:1-14.
40. Srivastava, A., Sharma, A. and Suneetha, V. 2011. Feather waste biodegradation as a source of amino acids. European Journal of Experimental Biology 1:56-63.
41. Sun, Z., Li, X., Liu, K., Chi, X. and Liu, L. 2021. Optimization for Production of a Plant Growth Promoting Agent from the Degradation of Chicken Feather Using Keratinase Producing Novel Isolate *Bacillus pumilus* JYL. Waste and Biomass Valorization 12:1943-1954.
42. Tiwary, E. and Gupta, R. 2012. Rapid conversion of chicken feather to feather meal using dimeric keratinase from *Bacillus licheniformis* ER-15. J Bioprocess Biotech 2: 123.
43. Van Zinderen Bakker, E.M. 1986. Development of hydroponic systems and a look into the future. Section III. In Proceedings 7th Annual Conference on Hydroponics. Hydroponic Society of America, Concord, CA (pp. 73-74).
44. Vasileva-Tonkova, E., Gousterova, A. and Neshev, G. 2009. Ecologically safe method for improved feather wastes biodegradation. International Biodeterioration and Biodegradation 63:1008-1012.
45. Verma, A., Singh, H., Anwar, M.S., Kumar, S., Ansari, M.W. and Agrawal, S. 2016. Production of thermostable organic solvent tolerant keratinolytic protease from *Thermoactinomyces* sp. RM4: IAA production and plant growth promotion. Frontiers in Microbiology 7:1189.
46. Vernieri, P., Borghesi, E., Tognoni, F., Serra, G., Ferrante, A. and Piagessi, A. 2006, October. Use of biostimulants for reducing nutrient solution concentration in floating system. In III International Symposium on Models for Plant Growth, Environmental Control and Farm Management in Protected Cultivation 718:477-484.
47. Williams, C.M., Richter, C.S., MacKenzie Jr, J.M. and Shih, J.C. 1990. Isolation, identification, and characterization of a feather-degrading bacterium. Applied and Environmental Microbiology 56:1509-1515.

Effect of metabolites obtained from microbial degradation of chicken feathers on lettuce growth

L. Ahmadi, K. Khavazi[1], J. Baharlouei, and M. H. Davoodi

PhD student, Department of Soil Science, Islamic Azad University, Isfahan (Khorasgan) Branch; E-mail: leili.ahmadi5@yahoo.com

Professor, Soil and Water Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization; E-mail: khavazik@yahoo.com

Assistant Professor, Department of Soil Science, Islamic Azad University, Isfahan (Khorasgan) Branch; E-mail: j.baharlouei@khuisf.ac.ir

Assistant Professor, Soil and Water Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization; E-mail: davoodi_mh@yahoo.com

Received: September, 2021 & Accepted: January, 2022

Abstract

In this study, keratinase-producing bacteria were used to produce natural fertilizer from chicken feathers. Twenty-nine soil samples were collected from 0-30 cm depth of agricultural fields and mixed with chicken feathers. After three weeks, 31 isolates were isolated from the soils mixed with feathers, which were able to grow on the special culture medium of Feather Meal Agar (FMA). The isolates were transferred to a liquid medium containing feathers and their ability to degrade the feathers was investigated. A completely randomized design was used to examine the effect of the solution created by the degradation of chicken feathers on lettuce growth. The experimental treatments included the foliar application of three solutions obtained from the degradation of chicken feathers (gh1, b1, c11), and control (distilled water). The results showed eight isolates were able to completely decompose the feathers in seven days by producing keratinase enzyme. The highest activity of the keratinase enzyme (with the ability to fully degrade the feather: 8.56 U / ml) was related to that of *Bacillus methylotrophic strain* gh1. Also, the maximum concentration of free amino acid (1065 µg / ml) was observed in the growth medium of *Bacillus siamensis strain* c11. The three solutions obtained from feather degradation had a significant effect ($p < 0.01$) on lettuce fresh weight, lettuce dry weight, and fresh root weight. The results showed that the lettuce fresh weight increased by 28.8%, 26.1%, and 14.1%, using *Bacillus methylotrophicus (*gh1), *Bacillus velezensis* (b1), and *Bacillus siamensis (*c11) respectively, compared to the control. In addition, the lettuce dry weight increased by 25.7%, 19.9%, and 15.2%, with the aid of gh1, b1, and c11 treatments, respectively, compared to the control. The results showed that using keratinase-producing bacteria, feather degradation could be increased, and the obtained product can be used as a growth stimulant for lettuce.

Keywords: Free amino acid, Growth stimulant, Keratin, Soil

[1] Corresponding author: Responsible author: Karaj, Standard Square, Meshkindasht Road, Imam Khomeini Boulevard, Soil and Water Research Institute.