

Anna CHOIŃSKA, Anna RODZIEWICZ, Krzysztof CYBULSKI

e-mail: choinskaa@o2.pl

Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Wydział Nauk o Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy, Wrocław

Opracowanie wieloorganizmowej szczepionki do kompostowania szczeciny

Wstęp

Przemysł mięsny i drobiowy w Polsce generują rocznie miliony ton odpadów organicznych, do których zalicza się szczecina świńska. Głównym składnikiem budulcowym szczeciny są białka włókienkowe z rodziny keratyn, które nadają jej wytrzymałość mechaniczną oraz odporność na działanie enzymów proteolitycznych, czynników chemicznych i fizycznych. Z tego względu odpady keratynowe są trudno-degradowalne i uciążliwe dla środowiska. Keratyny włosów, szczeciny i wełny w przewodzie mają strukturę alfa, zatem są bardziej odporne na biodegradację niż keratyny piór, w których dominuje struktura beta.

Dopuszczalną metodą przetwarzania szczeciny jest m.in. współspalanie w piecach energetycznych [Nikodem, 2006], jednak metoda ta jest zarówno nieekonomiczna jak i nieekologiczna.

Biologiczne zagospodarowanie odpadów keratynowych poprzez kompostowanie wydaje się najbardziej perspektywicznym kierunkiem działania. Za pomocą tej metody utylizuje się w Polsce zaledwie kilka procent odpadów organicznych, głównie komunalnych [Lupa, 2010]. Klasyczne kompostowanie zachodzi przy udziale autochtonicznej mikroflory, która jest niewystarczająca w przypadku opornych na biodegradację substancji, na przykład odpadów keratynowych. Wymagane jest wówczas wspomaganie procesu szczepionką mikroorganizmów o uzdolnieniach keratynolitycznych [Rodziewicz i in., 2010]. Niektóre drobnoustroje naturalnie zasiedlające odpady są zdolne również do ich rozkładu [Kim i in., 2001], jednak jest to proces bardzo czasochłonny i mało wydajny. Wzbogacenie mikroflory kompostu wyselekcjonowanymi szczepami drobnoustrojów umożliwi efektywne kompostowanie oraz korzystnie wpływa na przebieg procesu.

Celem badań było opracowanie wieloorganizmowej szczepionki mikroorganizmów przyspieszających biodegradację szczeciny świńskiej podczas jej kompostowania w skali laboratoryjnej.

Materiały i metody

Materiał badawczy stanowiła świeża, rozdrobniona szczecina świńska pochodząca z ubojni trzody chlewnej. Przedmiotem badań było pięć szczepów bakterii keratynolitycznych z rodzaju *Bacillus*: *B. subtilis* P22, *B. cereus* B5e/sz, *B. subtilis* B3, *B. polymyxa* B20 oraz termofilny szczep *Bacillus* sp. T16, cztery szczepy grzybów strzępkowych: *Trichoderma* sp. K1, *T. asperellum* B35 (preparat handlowy), *Aspergillus* sp. KG12 i *Alternaria* sp. G0 a także dwa szczepy drożdży *Yarrowia lipolytica* PII6a i *Geotrichum candidum* PH1. Wymienione szczepy, z wyjątkiem *T. asperellum* B35, pochodzą z kolekcji własnej Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Bakterie i grzyby strzępkowe zostały wyizolowane ze składowiska odpadów keratynowych, natomiast drożdże pochodziły z sera pleśniowego typu rokpól.

Hodowle mikroorganizmów. Prowadzono sześciodobowe hodowle wstrząsane bakterii mezofilnych w temperaturze 28°C oraz termofilnych w temperaturze 55°C a także trzytygodniowe hodowle grzybów strzępkowych w temperaturze 28°C na podłożu syntetycznym zawierającym oprócz składników mineralnych 0,05% YE oraz 1% odtuszczonego piór jako źródła C i N [Rodziewicz i in., 2006].

Komposty laboratoryjne sporządzano w szklanych kolbach Roux. Masę kompostową w ilości 170 g stanowiła natywna szczecina i wiórki drzewne w stosunku 15:1, przy zachowanym stosunku C:N równym

25:1, o wilgotności 60%. Kompostowanie prowadzono w dwóch wariantach: z zastosowaniem szczepionki monokulturowej i wieloorganizmowej. Komposty ze szczepionką wieloorganizmową inokulowano co 3 doby monokulturami w kolejności: *B. cereus* B5e/sz, *Bacillus* sp. T16, *B. subtilis* P22, *Y. lipolytica* PII6a, *Trichoderma* sp. K1, *Aspergillus* sp. KG12. Kolby umieszczano w pomieszczeniu o temperaturze 28°C na okres 4–7 tygodni, napowietrzając je okresowo poprzez wstrząsanie. Przebieg procesu monitorowano na podstawie pomiaru: temperatury, wilgotności oraz ubytku suchej masy. Kompostowanie z udziałem szczepionek jednoorganizmowych prowadzono przez 4 tygodnie natomiast z udziałem szczepionek wieloorganizmowych przez 7 tygodni. Kontrolę stanowiły komposty nieinokulowane (K1) oraz sterylne (K2).

Metody analityczne. Badano aktywność enzymatyczną płynów pohodowlanych w ich supernatantach. Aktywność keratynolityczną oznaczono wobec keratyny rozpuszczalnej, w pH 7,5 w czasie 20 min, w temperaturze 40°C i wyrażono w jednostkach aktywności [JK], co odpowiadało zmianie absorbancji (E_{280}) o 0,01 w przeliczeniu na mililitr płynu pohodowlanego na minutę [Rodziewicz i in., 2006]. Aktywność proteolityczną oznaczono wobec kazeiny w pH 7,5 w czasie 20 minut, w temperaturze 30°C i wyrażono w jednostkach aktywności [JP], które odpowiadały zmianie absorbancji (E_{280}) o 0,01 w przeliczeniu na mililitr płynu pohodowlanego na minutę [Rodziewicz i in., 2006]. Aktywność proteolityczną kompostów oznaczano wobec kazeiny i wyrażano w mikromolach tyrozyny utworzonej w ciągu minuty na gram s.m. kompostu [JP/g]. Aktywność dehydrogenaz w kompoście badano metodą *Casidy* [Casida i in., 1964] względem chlorku 2,3,5-trifenilo tetrazoliowego (TTC) i wyrażano w mikromolach powstałego 1,3,5-trifeniloformazanu (TPF) w ciągu 20 godzin na gram s.m. kompostu [JD/g]. Stężenie rozpuszczalnego białka oznaczano metodą *Lowry'ego* [Lowry i in., 1951]. Ilość grup sulfhydrylowych aminokwasów oznaczono metodą *Ellmanna* za pomocą kwasu DNTB z cystaminą [Riener i in., 2002], natomiast grup aminowych przy użyciu TNBS [Snyder i Sobociński, 1975]. Końcowy ubytek substratu w kompostach oceniono na podstawie ubytku suchej masy w temperaturze 105°C metodą wagową. Obliczano procentową różnicę między początkową a końcową suchą masą kompostów inokulowanych, a także między końcową masą kompostu inokulowanego oraz kontrolnego nieinokulowanego.

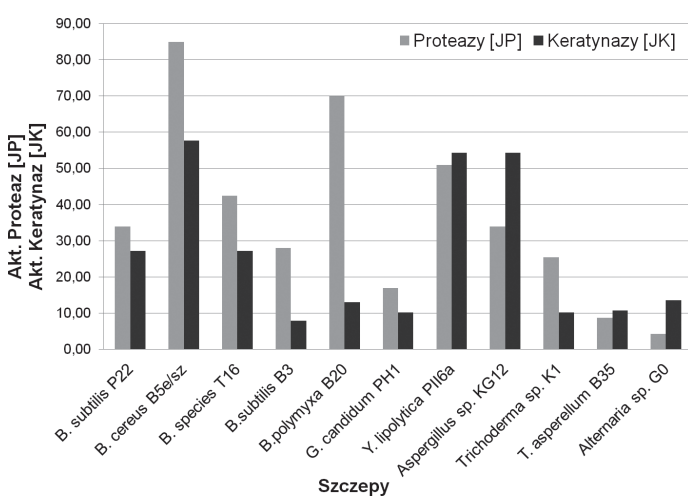
Wyniki i dyskusja

Proces kompostowania obejmuje wielokierunkowe przemiany biochemiczne, które wymagają zintegrowanego działania enzymów i innych metabolitów wydzielanych przez konsorcjum mikroorganizmów. W hodowlach na podłożu płynnym wstępnie oceniano uzdolnienia proteolityczne i keratynolityczne badanych szczepów. Największą aktywność proteolityczną wykazywały bakterie z rodzaju *Bacillus*. W płynie pohodowlanym szczepu *B. cereus* B5e/sz aktywność enzymów proteolitycznych i keratynolitycznych, wynosiła odpowiednio 85 JP i 58 JK (Rys. 1). Wysokie uzdolnienia keratynolityczne na poziomie 53 JK, wykazał również szczep drożdży *Y. lipolytica* PII6a oraz szczep grzybów strzępkowych *Aspergillus* sp. KG12. Zastosowanie metody przesiewowej (*screening*) pozwoliło na wytypowanie sześciu szczepów drobnoustrojów o największych uzdolnieniach keratynolitycznych. Do dalszych badań zakwalifikowano trzy szczepy bakterii: *B. cereus* B5e/sz, *B. subtilis* P22 i *Bacillus* sp. T16, jeden szczep drożdży *Y. lipolytica*

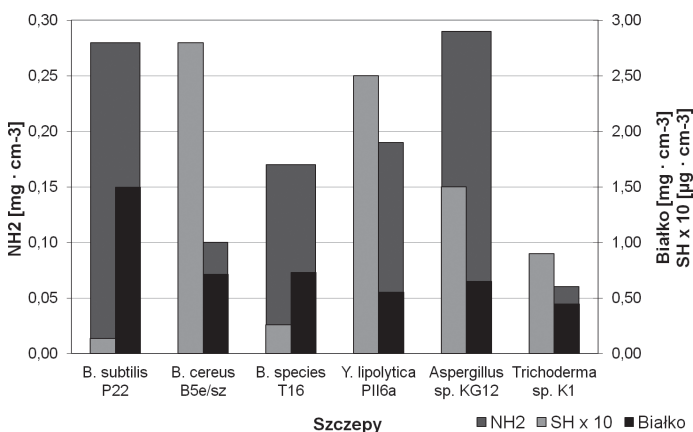
PII6a i dwa szczepy grzybów strzępkowych *Aspergillus* sp. KG12 i *Trichoderma* sp. K1.

Pozakomórkowe enzymy keratynolityczne, wydzielane w czasie hodowli mikroorganizmów, spowodowały częściową hydrolizę keratyny piór. W płynach pochowaniach wybranych szczepów wykazano przyrost stężenia białka rozpuszczalnego na poziomie 0,5–0,7 mg/cm³. Szczep *B. subtilis* P22 wyróżniał się większą zdolnością keratynolizy, gdyż enzymatycznie uwalniał 1,5 mg/cm³ białka, a jednocześnie 0,28 mg/cm³ grup aminowych aminokwasów.

Na uwagę zasługuje również wysoka zdolność bakterii *B. cereus* B5e/sz i drożdży *Y. lipolytica* PII6a do nagromadzenia aminokwasów siarkowych (grup SH) odpowiednio 2,8 oraz 2,5 µg/cm³ (Rys. 2). Ich uwalnianie poprzedzone jest redukcją mostków disiarczkowych utrzymujących strukturę keratyny. W mechanizmie tym mogą uczestniczyć zarówno enzymy oksydoredukcyjne np. reduktaza disulfidowa jak i czynniki chemiczne (siarczan IV lub tiosiarczan). Ostatecznie akumulacja cysteiny w środowisku zachodzi z udziałem specyficznych proteaz wydzielanych przez mikroorganizmy [Łaba i Rodziewicz, 2010].

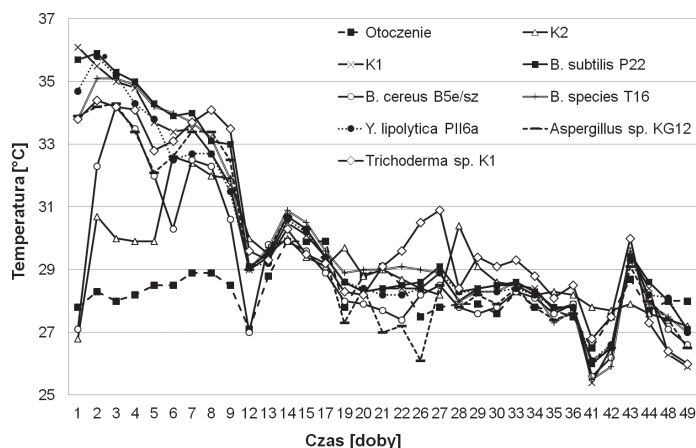


Rys. 1. Uzdolnienia proteolityczne i keratynolityczne badanych szczepów bakterii, drożdży i grzybów strzępkowych w warunkach hodowli wstrząsanej, na podłożu z dodatkiem pierza, jako źródła węgla i azotu



Rys. 2. Uwalnianie aminokwasów (grup NH₂ i SH) oraz rozpuszczalnych białek w hodowli wybranych szczepów drobnoustrojów

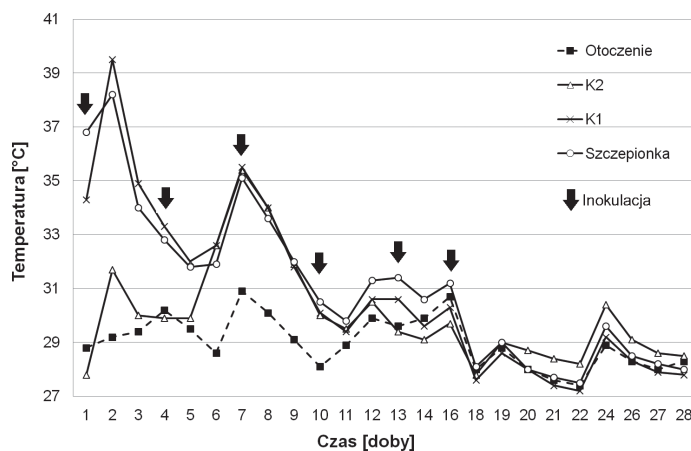
W kompostach laboratoryjnych także obserwowano sukcesywny rozkład szczeciny. Przebieg procesu we wszystkich kompostach zaszczipianych monokulturami był podobny. Temperatura kompostów wzrastała w pierwszych kilkunastu dobach maksymalnie do 36°C, po czym następowało jej wyrównanie z temperaturą otoczenia (Rys. 3). Taki przebieg kompostowania był niekorzystny, ponieważ w tych warunkach patogeniczna mikroflora może przetrwać i stanowić źródło skażenia mikrobiologicznego. Z drugiej strony podwyższona temperatura, osiągnięta w fazie termofilnej jest bardzo korzystnym czynnikiem



Rys. 3. Zmiany temperatury w kompostach inokulowanych monokulturami drobnoustrojów

rozwoju drobnoustrojów wprowadzonych w postaci szczepionki oraz autochtonicznej mikroflory kompostowej, sprzyjającym nasileniu procesu biodegradacji szczeciny.

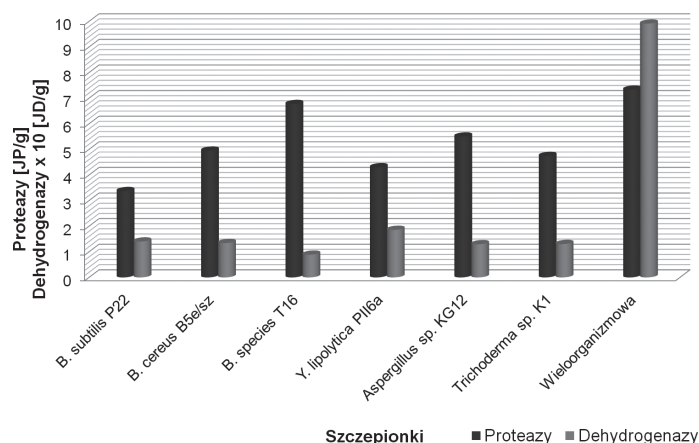
Bardziej intensywnie niż w przypadku kompostów inokulowanych monokulturami, przebiegał proces kompostowania szczeciny z udziałem szczepionki wieloorganizmowej. Temperatura masy kompostowej była trochę wyższa i osiągała poziom 38–39°C (Rys. 4). Podobne wyniki badań uzyskiwały [Bohacz i Kornilowicz-Kowalska, 2009]. W procesie kompostowania pierza z korą i słomą o masie 4 kg, temperatura osiągała maksymalnie 41°C oraz brakowało wyraźnej fazy termofilnej. Uzasadnione to było niską zawartością łatwo przyswajalnych źródeł węgla organicznego i relatywnie małą objętością masy kompostowanej.



Rys. 4. Zmiany temperatury w kompostach inokulowanych szczepionką wieloorganizmową

Aktywność enzymatyczna proteaz w kompostach inokulowanych monokulturami lub szczepionką wieloorganizmową była w mniejszym stopniu zróżnicowana niż dehydrogenaz i zawierała się w granicach 3,4–7,3 JP/g (proteazy) oraz 0,09–0,99 JD/g (dehydrogenazy). Aktywność enzymów oksydoredukcyjnych w kompoście jest wskaźnikiem aktywności metabolicznej obecnej tam mikroflory. Najwyższe aktywności zarówno dehydrogenaz jak i proteaz wykazano w kompoście inokulowanym szczepionką wieloorganizmową, gdzie wynosiły one odpowiednio 0,99 JD/g i 7,3 JP/g (Rys. 5). Uzyskane wyniki sugerują wyższą aktywność mikroflory kompostu i większe zaawansowanie hydrolizy białek szczeciny w tym kompoście w porównaniu z kompostami inokulowanymi pojedynczymi szczepami

Bezpośrednim wskaźnikiem efektywności kompostowania jest ubytek masy kompostu po zakończeniu procesu oraz właściwości organoleptyczne uzyskanego produktu. Ubytek masy kompostów inokulowanych monokulturami mieścił się w granicach od 39,7 do 49% a po



Rys. 5. Aktywność enzymatyczna kompostów inokulowanych monokulturami i szczepionką wieloorganizmową

uwzględnieniu kontroli nieinokulowanej (K1) był niższy i zawierał się w przedziale od 0,1 do 9,4% (Tab. 1). Proces rozkładu materii organicznej najintensywniej zachodził przy udziale szczepionki *B. species* T16, gdzie biodegradacji uległa prawie połowa mieszanki kompostowej. Szczepionki monokultur z wyjątkiem szczepów *B. subtilis* P22 i *Aspergillus* sp. KG12, spowodowały zwiększenie efektywności degradacji składników kompostu o 7–9% w porównaniu do autochtonicznej mikroflory. Ubytek masy kompostu inokulowanego szczepionką wieloorganizmową względem kontroli nieinokulowanej był wyższy i wynosił 21,62%, co sugeruje że rozkład materii organicznej zachodził w nim 2–3-krotnie wydajniej w porównaniu do kompostów inokulowanych monokulturami (Tab. 1 i 2). Ubytek suchej masy w obu kontrolach sterylnych (K2) miał zbliżoną wartość niezależnie od czasu kompostowania i wynosił 22–23% (Tab. 1 i 2).

Tab. 1. Ubytek suchej masy kompostów inokulowanych szczepionkami monokultur

Szczepionka inokulacyjna	Ubytek s.m. względem próby wyjściowej [%]	Ubytek s.m. względem kontroli nieinokulowanej (K1) [%]
<i>B. subtilis</i> P22	39,74	0,1
<i>B. species</i> T16	49,01	9,37
<i>B. cereus</i> B5e/sz	47,07	7,43
<i>Y. lipolytica</i> PII6a	47,31	7,67
<i>Aspergillus</i> sp. KG12	39,78	0,14
<i>Trichoderma</i> sp. KP1	47,62	7,98
Kontrola niesterylna (K1)	39,64	–
Kontrola sterylna (K2)	23,08	–

Tab. 2. Ubytek suchej masy kompostu inokulowanego szczepionką wieloorganizmową

Szczepionka inokulacyjna	Ubytek s.m. względem próby wyjściowej [%]	Ubytek s.m. względem kontroli nieinokulowanej (K1) [%]
Wieloorganizmowa	47,1	21,62
Kontrola niesterylna (K1)	25,48	–
Kontrola sterylna (K2)	22,3	–

Użycie sześciorganizmowej szczepionki, w skład której wchodziły zarówno bakterie, grzyby strzępkowe jak i drożdże o uzdolnieniach keratynolitycznych, umożliwiło naruszenie struktury białek keratynowych szczeciny i jej częściową degradację. Przeciwnie, w kompoście kontrolnym autochtoniczne mikroorganizmy nie były zdolne do rozwoju przy braku łatwo dostępnego źródła C i N.

Wnioski

- Spośród 11 badanych szczepów mikroorganizmów do dalszych badań wybrano sześć, które były podstawą wieloorganizmowej szczepionki. W jej skład wchodziły szczep: *B. cereus* B5e/sz, *B. subtilis* P22, *Bacillus* sp. T16, *Y. lipolytica* PII6a, *Aspergillus* sp. KG12 i *Trichoderma* sp. K1. Ze względu na keratynolityczne uzdolnienia ww. szczepów mogą one znaleźć zastosowanie jako składniki szczepionek do kompostowania szczeciny.
- Inokulacja kompostu szczepionką wieloorganizmową umożliwiła zapoczątkowanie procesu biodegradacji keratyny, głównego składnika budulcowego szczeciny.
- Dalsza optymalizacja warunków kompostowania z uwzględnieniem składu, ilości i proporcji komponentów, a także techniki prowadzenia procesu, może doprowadzić do opracowania technologii kompostowania szczeciny z większą wydajnością oraz w większej skali.

LITERATURA

- Bohacz J., Kornilowicz-Kowalska T., 2009. Changes in enzymatic activity in composts containing chicken feathers. *Bioresource Technology*, 100, 3604–3612. DOI: 10.1016/j.biortech.2009.02.042
- Casida L.E. Jr., Klein D.A. and Santoro T., 1964. Soil dehydrogenase activity. *Soil Science*, Vol. 98, 371–376. DOI:10.1097/00010694-196412000-00004
- Kim J.M., Lim W.J., Suh H.J., 2001. Feather-degrading *Bacillus* species from poultry waste. *Process Biochem.*, 37, 287–291. DOI: 10.1016/S0032-9592(01)00206-0
- Ladd, J.N., Butler, J.H.A., 1969a. Inhibitory effect of soil humic compounds on the proteolytic enzyme pronase. *Australian Journal of Soil Research*, 7, 241–251. DOI: 10.1071/SR9690241
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265–273
- Lupa P., 2010. Kompostowanie odpadów komunalnych w świetle koncepcji świadczeń ekosystemów. *Ekonomia i Środowisko*, 1, nr 37, 237–251
- Łaba W., Rodziewicz A., 2010. Keratynolityczny potencjał feather-degrading *Bacillus polymyxa* and *Bacillus cereus*. *Polish J. of Environ. Stud.*, 19, 2, 371–378
- Nikodem W., 2006. Prawne i techniczne warunki spalania mączki zwierzęcej w kotłach energetycznych. *Energetyka*, nr 2, 113–117
- Riener C.R., Kada G., Gruber H.J., 2002. Quick measurement of protein sulfhydryls with Ellman's reagent and with 4,4'-dithiodipyridine. *Anal. Bioanal. Chem.*, 373, nr 4-5, 266–276. DOI: 10.1007/s00216-002-1347-2
- Rodziewicz A., Baranowska K., Łaba W., Sobolczyk J., 2006. Właściwości keratynolityczne oraz tworzenie biofilmu przez bakterie *Bacillus subtilis*. *Acta Sci. Pol., Biotechnologia*, 5, 61–73
- Rodziewicz A., Sobolczyk J., Łaba W., Choińska A., 2010. Ilościowe i jakościowe zmiany drobnoustrojów podczas kompostowania pierza z udziałem szczepionki keratynolitycznych bakterii. II Sympozjum Inżynierii Żywności. Warszawa, 113–114
- Snyder S.L., Sobociński P.Z., 1975. An improved 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid method for the determination of amines. *Anal. Biochem.*, 64, 284–288. DOI: 10.1016/0003-2697(75)90431-5

Badania były finansowane w ramach projektu badawczego rozwojowego przez NCBR NR 12001004, 2008–2010.