

LABORATORYJNE BADANIA SKUTECZNOŚCI SZCZEPIONKI BAKTERII BACILLUS SUBTILIS B172 W DEGRADACJI NATYWNEGO PIERZA ODPADOWEGO

LABORATORY STUDIES OF THE EFFECTIVENESS OF THE BACILLUS SUBTILIS B172 INOCULUM IN THE DEGRADATION OF NATIVE WASTE FEATHERS

Justyna Sobolczyk-Bednarek, Anna Choińska - Pulit-„Poltegor – Instytut” Instytut Górnictwa Odkrywkowego, Wrocław
Wojciech Łaba - Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności

Kumulacja pierza drobiowego jako surowca odpadowego w środowisku naturalnym stanowi problem ekologiczny i sanitarny z uwagi na wysoką odporność na degradację oraz na możliwość występowania patogennych mikroorganizmów.

Prezentowane badania przybliżają możliwość wykorzystania szczepionki bakterii z rodzaju Bacillus do degradacji keratyny piór natywnych. Pióra szczepione bakteriami B. subtilis B172 w wyższym stopniu podlegały biodegradacji zarówno w hodowli wglębnej jak również w solid state, w stosunku do odpowiednika nieinokulowanego. Przejawiało się to w ubytku masy o 30% wyższym w hodowli inokulowanej, wizualnym obrazie oraz w parametrach biochemicznych keratynolizy, np. ilość białka rozpuszczalnego wyższa o 71% w stosunku do hodowli nieinokulowanej. Ponadto wykazano zdolność bakterii do tworzenia biofilmów na substracie keratynowym, co jest dodatkowym czynnikiem mogącym intensyfikować proces keratynolizy.

Przeprowadzone badania wskazują alternatywną i ekologiczną metodę degradacji pierza kurzego z zastosowaniem szczepionki keratynolitycznych bakterii B. subtilis B172.

Słowa kluczowe: Bacillus subtilis, biofilm, pióra kurze, keratynaza, biodegradacja

Accumulation of chicken feathers waste in natural environment presents an ecological and sanitary issue due to the high resilience of keratin against degradation and possible occurrence of pathogenic microorganisms.

The presented research highlight the possible application bacterial inoculum from the genus Bacillus for biodegradation of native feather keratin. Feathers inoculated with B. subtilis B172 underwent advanced decomposition in liquid cultures, as well as in solid-state conditions, as compared with an uninoculated control. It was manifested by the substrate loss increased by 30%, visual changes in the substrate and biochemical indicators of keratinolysis, e.g. concentration of soluble proteins increased by 71%, in comparison to a control. In addition, capability of the tested bacteria to formation of a biofilm structure on the keratinic substrate was demonstrated, as an additional factor to intensify the process of keratinolysis.

The conducted research allowed to propose an alternative and environment-friendly method for waste feathers degradation with an application of B. subtilis B172 keratinolytic bacteria.

Keywords: Bacillus subtilis, biofilm, chicken feathers, keratinase, biodegradation

Wprowadzenie

Poruszany temat badań jest odpowiedzią na potrzeby zakładów przemysłu drobiowego, które borykają się z zagospodarowaniem odpadów, gdyż tylko w Polsce rocznie generują one 5,39 mln ton (2008 r.) odpadów w postaci pierza. Problem ekologiczny wynika z faktu, że pierze zbudowane jest z białka włókienkowego keratyny, które jest wysoce odporne na degradację środkami fizycznymi, chemicznymi, jak również powszechnie dostępnymi enzymami- papaina, tripsyna. Generowanie dużych ilości odpadów keratynowych i ich kumulacja w środowisku naturalnym stanowi zagrożenie sanitarne, wynikające z niedostępności dla drobnoustrojów i enzymów białek keratynowych, które stanowią około 90% masy tych struktur [1]. Aminokwasy budujące keratyny mają

w 40% charakter hydrofilowy oraz w 60% hydrofobowy. W sekwencji aminokwasów duży udział ma cystyna, odpowiedzialna za wysoką liczbę wiązań disiarczkowych. W keratynie piór stanowi ona 7% wszystkich aminokwasów i jej ilość jest 2,5 razy wyższa w stosunku do keratyny naskórki, rogów i paznokci. W strukturze drugorzędowej długich łańcuchów polipeptydowych przeważają α - helisy (41%) oraz β - struktury (38%), natomiast pozostałe tworzą struktury nieuporządkowane [2,3,4]. Wskutek tak złożonej budowy wykazują wysoką odporność na degradację i jednocześnie kumulując się w środowisku stanowią siedlisko patogennych bakterii. Stosowane dotychczas termiczne metody utylizacji odpadów keratynowych, w połączeniu z wapniowaniem czy spalaniem są mało ekologiczne i nieekonomiczne, ze względu na zapotrzebowanie energetyczne oraz wprowadzanie do

środowiska związków chemicznych [5,3,6,7]. Alternatywą dla takiego postępowania może być biologiczna dekompozycja odpadów keratynowych. Pióra ptaków są naturalnym miejscem zasiedlanym przez różne mikroorganizmy keratynofilne. Wśród nich występują również drobnoustroje patogene, jednak większą część stanowią saprofity, pochodzenia glebowego [4]. Wiele spośród mikroorganizmów zdolnych jest do syntezy pozakomórkowych proteaz, degradujących keratyny. Znaczącą grupę stanowią bakterie, z których większość należy do grupy gramdodatnich. Szczególnie ważne są bakterie z rodzaju *Bacillus* np. *B. subtilis*, *B. licheniformis* i inne [8,9]. Dodatkowo bakterie z rodzaju *Bacillus* tworzą biofilmy złożone ze skupiska komórek otoczonych macierzą pozakomórkową- matrix, w skład którego wchodzi polisacharydy, białka, kwasy nukleinowe, kwasy uronowe. Taka forma życia daje komórkom większą przewagę w stosunku do komórek planktonicznych. Tworzenie biofilmów znacznie ułatwia procesy degradacyjne składników trudno degradowalnych [5,10].

Zainteresowanie utylizacją pierza na drodze mikrobiologicznej wynika nie tylko z problemów ich zagospodarowywania, lecz także wykorzystania ich bogactwa aminokwasowego, które predestynuje je jako źródło paszy dla zwierząt. Traktowanie ich enzymami proteolitycznymi podnosi przydatność odżywczą piór o takie aminokwasowe egzogenne jak lizyna, metionina i treonina. [1,11]. Ponadto wykorzystanie enzymów proteolitycznych wytwarzanych przez bakterie może mieć zastosowanie w wielu gałęziach przemysłu m.in. garbarskim, farmaceutycznym, spożywczym oraz w rolnictwie [12, 6, 13, 14, 15, 3, 16, 9, 5, 17].

Keratynazy są szeroko rozpowszechnioną grupą proteaz serynowych lub metaloproteaz, które mają przeważnie charakter pozakomórkowy, choć spotyka się także wewnątrzkomórkowe [3]. Mikroorganizmy są zdolne do wytwarzania enzymów keratynolitycznych na drodze indukcji substratowej w obecności surowców keratynowych, wykorzystując je jako źródło węgla i azotu. Keratynazy są wydzielane do środowiska w obecności odpowiednich substratów takich jak: wełna, włosy, rogi oraz pióra [16].

Prezentowane badania mają na celu przybliżenie warunków półtechnicznych i technicznych procesu kompostowania oraz wskazanie możliwości wykorzystania szczepionki w tych procesach. Sprawdzenie skuteczności działania przygotowanej szczepionki bakterii *Bacillus subtilis* B172 na rozkład keratyny pierza nieodtłuszczonego przeprowadzono w dwóch rodzajach hodowli: wglębnej jak również solid state (minikomposty). Skuteczność działania wybranej szczepionki bakterii została porównana z hodowlą kontrolną, której proces degradacji pierza odbywał się z udziałem mikroflory epifitycznej. Bakterie te zostały również sprawdzone pod kątem zdolności tworzenia biofilmów na substracie keratynowym.

Przesłanką do badań były wcześniejsze badania uzdolnień keratynolitycznych bakterii *Bacillus subtilis* B172, które odbywały się w warunkach hodowli na piórach oczyszczonych i odtłuszczonych

Metodyka badań

Material badawczy

Material badawczy stanowił szczep bakterii *Bacillus*

subtilis B172, pochodzący z kolekcji własnej Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.

Pióra kurcząt koloru białego rasy Leghorn pochodziły z gospodarstw przydomowych w okolicy Wrocławia.

Identyfikacja szczepu i analiza filogenetyczna

Genomowe DNA zostało wyizolowane z 12 h wstrząsanych hodowli bakterii w podłożu Luria-Bertani. Gen 16S rRNA został amplifikowany w reakcji PCR z użyciem starterów uniwersalnych: (27 R) AGAGTTTGATCGTGGCTCAG i (1492L R) GGTTACCTTGTTACGACT. Skład mieszaniny reakcyjnej PCR: 25 µL Taq PCR Master Mix (2x) (Eurx); 20 pmol każdego ze starterów, genomowy DNA 0.1 µg. Reakcja PCR została przeprowadzona przy następujących parametrach: wstępna denaturacja 94°C, 5 min, 35 cykli denaturacja 94°C, min, hybrydyzacja 53°C, 30 s, elongacja 72°C, 90 s oraz końcowa elongacja 72°C, 10 min. Produkt PCR został oczyszczony ze składników mieszaniny reakcyjnej oraz sekwencjonowany przez Centrum Badań DNA Sp. z o.o., Poznań, z użyciem starterów: 27 F, 1492L R oraz startera wewnętrznego (357 F) CTCCTACGGGAGGCAGCAG. Uzyskana sekwencja została porównana z bazami Ribosomal Database Project (RDP) release 10 oraz Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Analiza sekwencji oraz drzewo filogenetyczne zostały wykonane z użyciem MAFT wersja 7 oraz Archaeopteryx version 0.972+.

Hodowle wglębne

Wstrząsane hodowle wglębne prowadzono w kolbach Erlenmeyera o pojemności 500 ml w 200 ml podłoża syntetycznego S1 o składzie (g/dm³): MgSO₄ x 7H₂O 1; ekstrakt drożdżowy 0,5; KH₂PO 4 0,1; CaCl₂ 0,1; FeSO₄ x 7H₂O 0,01; pH 7,1 oraz 20 g surowca (pióra). Przeprowadzono także nieszczepione hodowle kontrolne.

Inokulum stanowiła 12-godzinna hodowla wstrząsana bakterii *B. subtilis* B172 na bulionie odżywczym, o przybliżonej gęstości 1x 10⁹ j.t.k./cm³, którym zaszczipiano poszczególne hodowle (5 ml inokulum na kolbę).

Zdolność tworzenia biofilmów prowadzono w siedmiodobowych hodowlach bakterii w podłożu syntetycznym S1, w obecności odtłuszczonego pierza kurzego według metody Wawrzkievicz w ilości 1% [18]. Hodowle były inkubowane w temperaturze 28°C przy wytrząsaniu 168 rpm.

Hodowle wglębne w kolbach Roux'a

Do kolb Roux'a o pojemności 1000 ml umieszczono po 80 g surowca (pióra) z dodatkiem 8 g trocin. Następnie do kolb wprowadzono po 35 ml podłoża syntetycznego zaszczipionego 1% inokulum bakterii *B. subtilis* B172 1x 10⁹ j.t.k./cm³. Kolby w pozycji poziomej przetrzymywano w temperaturze 30°C przez 47 dob.

Metody analityczne

W płynach pochodzących z hodowli uzyskanych po przeprowadzonych hodowlach w podłożu mineralnym (Tab. 8) z pierzem natywnym przeprowadzono analizę wskaźników keratynolizy.

Oznaczenie ilości białka wykonano metodą Lowry'ego, a jego stężenie wyrażono w mg/ml [19].

Oznaczanie grup sulfhydrylowych wykonano metodą

Ellmana [20].

Ilość wolnych grup sulfhydrylowych oznaczona metodą Ellmana została wyrażona w [mM].

Oznaczanie wolnych grup aminowych wykonano metodą TNBS [21], a jego ilość wyrażono w [mM].

Aktywność proteolityczną w płynach pochodzących oznaczono zmodyfikowaną metodą Ansona, przy długości fali $\lambda = 280$ nm [22] i wyrażono ją w międzynarodowych jednostkach aktywności [$\mu\text{mol/ml/min}$] = [JP], które oznaczają liczbę mikromoli produktu, uwolnionego przez 1 ml enzymu w czasie 1 minuty reakcji w temperaturze 30°C.

Oznaczanie aktywności keratynolitycznej w płynach pochodzących wykonano zmodyfikowaną metodą Ansona przy długości fali $\lambda = 280$ nm i wyrażono ją w międzynarodowych jednostkach aktywności [$\mu\text{mol/ml/min}$] = [JK], które oznaczają liczbę mikromoli produktu, uwolnionego przez 1 ml enzymu w czasie 1 minuty reakcji w temperaturze 40°C [22].

Wizualna ocena degradacji pierza

Stopień degradacji pierza w hodowlach wglębnych oceniano wizualnie na podstawie obserwacji makroskopowych oraz z użyciem mikroskopu świetlnego (pow. 400×).

W celu oceny adhezji komórek bakteryjnych do powierzchni materiałów keratynowych każdorazowo materiał keratynowy pobierano z kolb za pomocą ezy, płukano w sterylnym płynie fizjologicznym, a następnie sporządzano preparaty mikroskopowe.

Ubytek masy

Ubytek masy pierza w hodowlach płynnych badano po odsączeniu płynu pochodzącego na sączkach jakościowych, a następnie ważono na wagosuszarce firmy RADWAG WPS 110S w temperaturze 105°C. Ubytek suchej masy stanowiła różnica między próbą wyjściową a końcową, który wyrażono w [%].

Wyniki badań

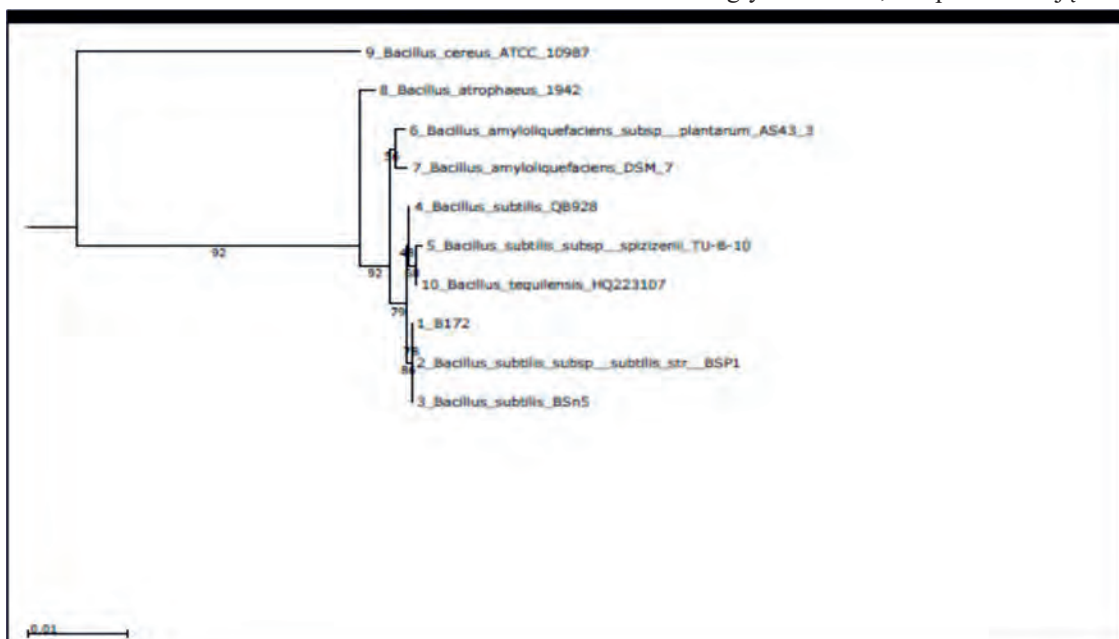
Identyfikacja szczepu

W efekcie sekwencjonowania genu rDNA izolatu B172 uzyskano niemal kompletną sekwencję długości 1417 nukleotydów. Wstępne porównanie uzyskanej sekwencji z bazą RDP ujawniło przynależność badanego szczepu do gatunku *Bacillus subtilis*. Analiza z użyciem BLAST potwierdziła pokrewieństwo bakterii do szczepu *Bacillus subtilis* BEST 7613 z podobieństwem 99%. Analiza filogenetyczna z użyciem metody neighbour-joining umiejscowiła izolat B172 w gałęzi mieszczącej szczepu *B. subtilis* subsp. *subtilis* BSP1 oraz *B. subtilis* BSn5 (Rys. 1).

Zdolność adhezji do substratów keratynowych

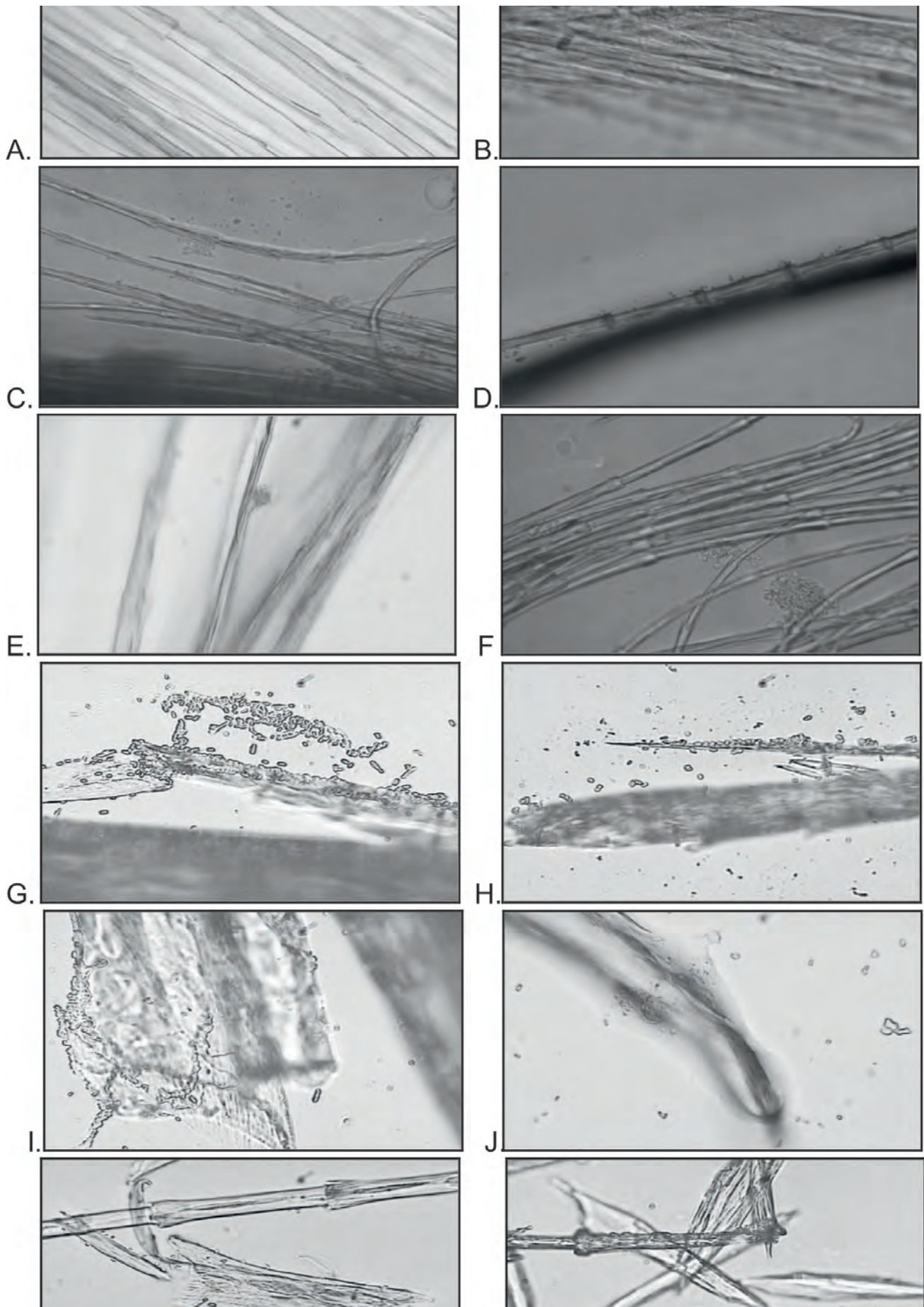
Bakterie *B. subtilis* B172 szybko kolonizowały powierzchnię piór kurzych. Na piórach kurzych w 24 i 48 godzinie hodowli obserwowano wyraźne, wielowarstwowe skupiska. W kolejnych dniach pojedyncze mikrokolonie łączyły się ze sobą pokrywając szczelnie powierzchnię piór grubą warstwą komórek i macierzy pozakomórkowej. W 72 godzinie hodowli widoczne było również wyraźne uszkodzenie struktury piór kurzych, zaś w 120 godzinie hodowli w podłożu znajdowały się niewielkie kawałki rozłożonych piór. W tym czasie na powierzchni piór nie zaobserwowano już obfitych biofilmów bakteryjnych (Fot. 1).

Szczep bakterii *B. subtilis* B172 przypuszczalnie wkroczył w logarytmiczną fazę wzrostu w ciągu pierwszych 24h (Rys. 2). Przekładało się to na wysoką aktywność proteolityczną w pierwszej dobie wynoszącą 14,75 JP, ale najwyższą uzyskał w 6 dobie 16 U/ml/. Aktywność proteaz w okresie od piętnastej do trzydziestej drugiej doby zmieniała się w przedziale od 1,5 JP do 4,75 JP, co przekłada się na uzyskanie najwyższej zawartości grup NH_2 w dwudziestej drugiej dobie wynoszące 4,54 mM. Początkowo ilość białka była na poziomie 2 mg/ml, zaś najwyższe jego stężenie wystąpiło w ósmej dobie i wynosiło 7,496 mg/ml. W kolejnych dobach wartości uległy obniżeniu, nie przekraczając 4 mg/ml.



Rys. 1. Dendrogram utworzony metodą neighbour-joining na podstawie analizy sekwencji genu 16S rDNA. *Bacillus cereus* ATCC 10987 został użyty jako szczep referencyjny

Fig. 1. Dendrogram from 16S rDNA gene sequence analysis, created by the neighbor-joining method. *Bacillus cereus* ATCC 10987 was used as an outgroup



Fot. 1. Pióra kurze w kolejnych dobach hodowli *Bacillus subtilis*, szczep B172 na podłożu syntetycznym S2: A, B - pióro przed rozpoczęciem hodowli; C, D - 24h hodowli; E, F - 48h hodowli; G, H - 72h hodowli; I, J - 96h hodowli; K, L - 120h hodowli

Phot. 1. Chicken feathers on consecutive days of culture of *Bacillus subtilis* strain B172 in synthetic medium S2: A, B - feather before the culture; C, D - 24-h culture; E, F - 48-h culture; G, H - 72-h culture; I, J - 96-h culture; K, L - 120-h culture

W prowadzonych okresach pomiarowych tylko w szóstej dobie odnotowano aktywność keratynolityczną, wynoszącą 1,25 [JK]. Szybki wzrost ilości grup tiolowych oraz aminowych w pierwszych czterech dobach hodowli był następstwem wysokiej aktywności wydzielonych proteaz w tym samym czasie. Najwyższa wartość stężenia grup tiolowych równa 0,109 mM została odczytana na początku, w czwartej dobie hodowli. W ciągu kolejnych trzydziestu dób procesu ilość grup sulfhydrylowych malała osiągając najniższą wartość równą 0,04 mM.

W przypadku hodowli kontrolnej wartości wszystkich wskaźników keratynolizy były na bardzo niskim poziomie. Najwyższa aktywność proteolityczna wynosiła niecałe 8 JP, co przełożyło się na niższą ilość białka, grup NH_2 oraz SH.

Potwierdzeniem wykonanych analiz biochemicznych jest wizualna dokumentacja degradacji pierza zarówno w hodowlach solid state jak również w hodowli wstrząsanej. Widoczny ubytek masy piór w hodowli wstrząsanej jest efektem syntezy enzymatycznej oraz zdolności rozkładu struktur keratynowych przez analizowany szczep. Dodatkowo wykonany pomiar ubytku masy pierza z hodowli wstrząsanej wskazuje, że w hodowli zaszczepianej wynosił on 68,3%, podczas gdy w hodowli z mikroflorą epifityczną był prawie o połowę mniejszy i wynosił 38,7%. W hodowli solid state po czterdziestu siedmiu dobach widoczne były zmniejszone objętości o około 40% (Fot. 2). To potwierdza

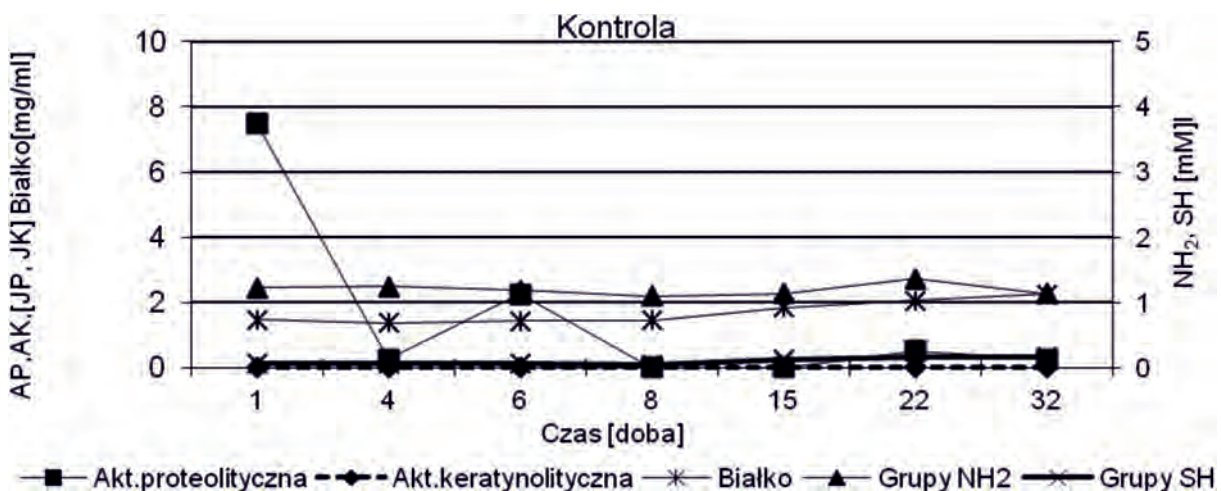
wysoki potencjał badanego szczepu w kierunku utylizacji natywnych piór kurcząt, przybliżając możliwość i warunki procesu kompostowania.

Dyskusja wyników

Większość prezentowanych prac o tematyce utylizacji pierza opartych jest na badaniach laboratoryjnych piór odtłuszczonych. Badania utylizacji piór natywnych najczęściej prowadzone są na poziomie technicznym i półtechnicznym na przykład w procesie kompostowania.

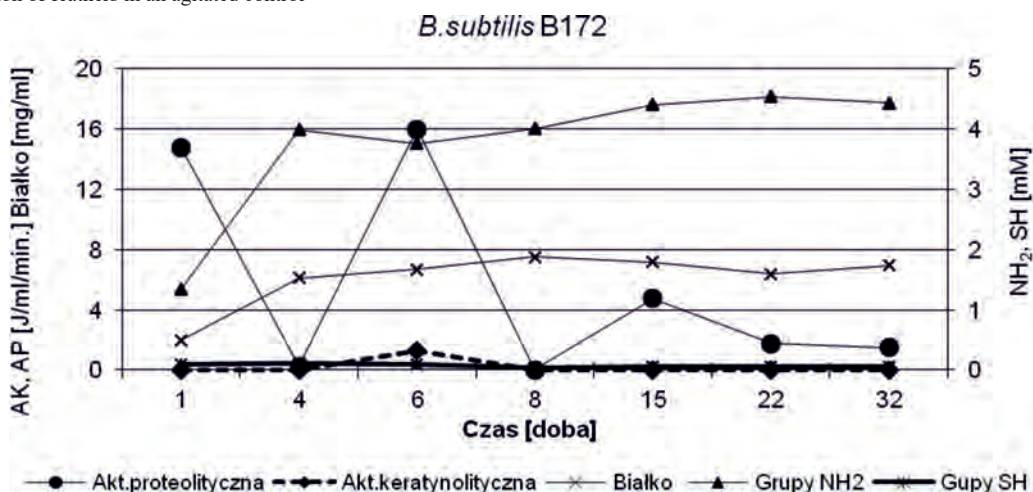
Proces dekompozycji pierza odtłuszczonego zasadniczo różni się od utylizacji pierza natywnego, które było podstawowym materiałem badawczym w pracy [17]. W związku z tym sprawdzono zdolność wytypowanego szczepu mikroorganizmów do utylizacji pierza natywnego w hodowli wstrząsanej oraz solid state.

Wybrany do badań szczep bakterii *B. subtilis* B 172 został wyizolowany z odpadów pierza kurczego, co jest częstym zabiegiem potwierdzonym licznymi badaniami. Gwarantuje to możliwość bytowania izolatu w podobnym środowisku i prowadzenie procesów biotechnologicznych [5, 23]. Badania własne pokazują, że pióra kurcze są dobrym materiałem do adhezji bakterii, tworząc biofilm, jednocześnie korzystając z nich, jako źródła węgla i azotu, intensyfikując proces dekompozycji pierza, co również potwierdzają liczne badania [24, 5].



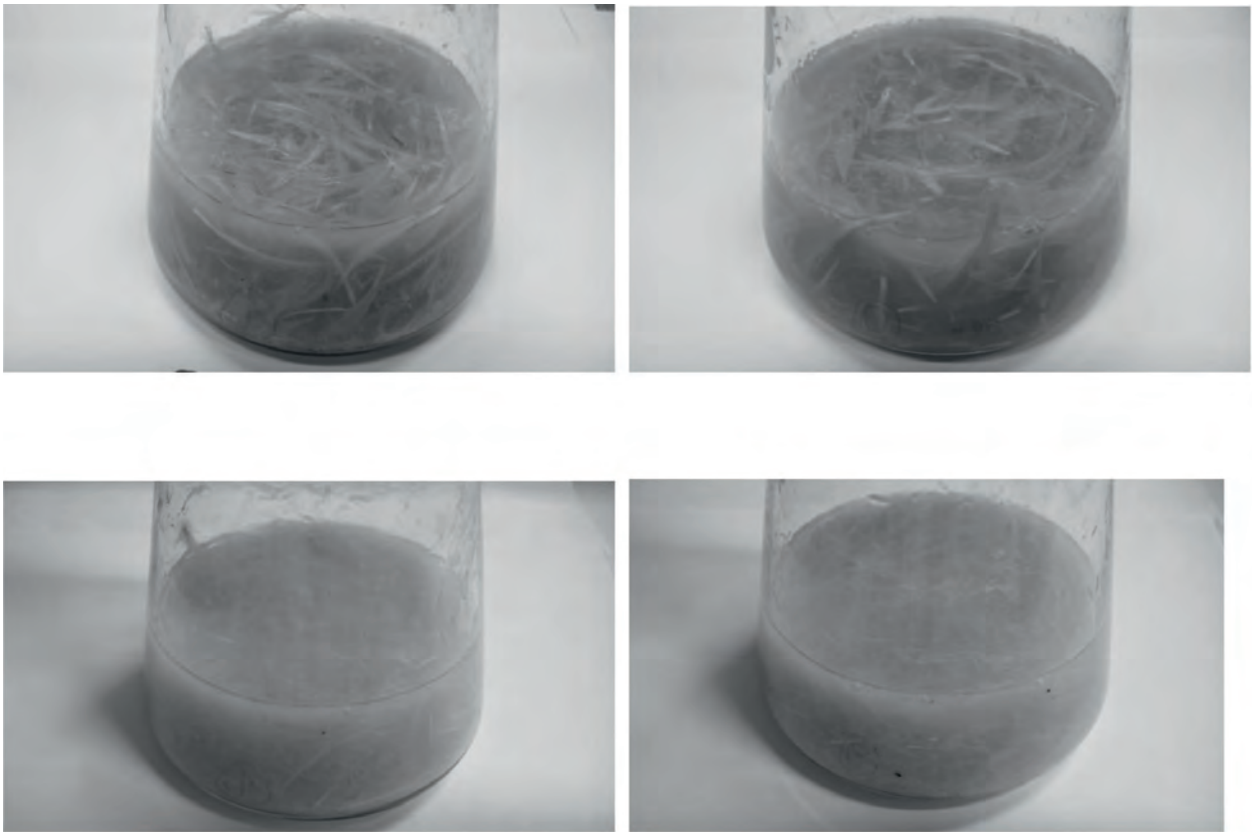
Rys. 2. Degradacja piór natywnych w kontroli wstrząsanej

Fig. 2. Degradation of feathers in an agitated control

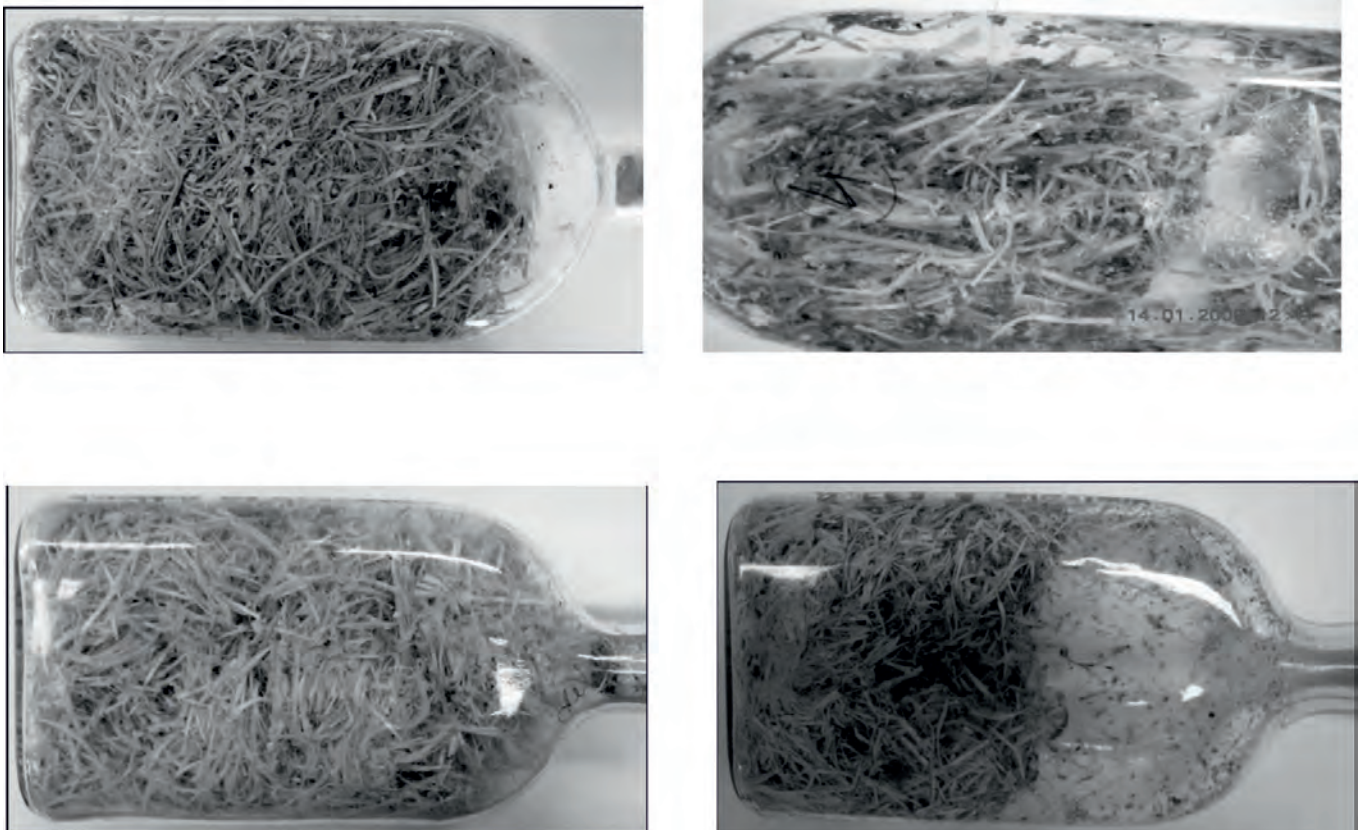


Rys. 3. Degradacja piór natywnych w hodowli wstrząsanej bakterii *B. subtilis* B172

Fig. 3. Disposal of feathers native in an agitated culture of *B. subtilis* B172 bacteria



Fot. 2. Hodowle płynne w zerowej dobie badań (górze) oraz po 32 dobach hodowli (dół). Po lewej inokulacja *B. subtilis* B172, po prawej hodowla kontrolna
 Phot. 2. Liquid cultures on the day 0 (up) and after 32 days (down). Left: inoculated with *B. subtilis* B172; right: a control



Fot. 3. Degradacja keratyny piór inokulowanych szczepem *B. subtilis* B172 w zerowej dobie (po lewej) oraz w czterdziestej siódmej dobie badań (po prawej).
 Góra- kontrola, dół- *B. subtilis* B 172
 Phot. 3. Degradation of feather keratin inoculated with *B. subtilis* B172 on the day 0 and after 47 days. Up- kontrol, down- *B. subtilis* B172

Ichida i wsp. [5], którzy prowadzili kompostowanie piór kurzych w dwóch wariantach w kompoście inokulowanym i nieinokulowanym, zaobserwowali, że w tym pierwszym biofilm bakterii był bardziej rozwinięty. Dowodzi to potrzebę inokulowania odpadów tak trudno degradowanych [5].

Istotą prowadzenia badań jest określanie wskaźników keratynolizy, pokazującej jej stopień. Podobnie jak w prezentowanych badaniach, również w wielu innych, aktywność proteolityczna występuje w początkowej fazie wzrostu, w ciągu 24 h, natomiast aktywność keratynolityczna w późnej fazie logarytmicznej lub stacjonarnej większości szczepów bakterii [9].

W badaniach aktywności keratynolitycznej szczepu *Flavobacterium sp.*, maksimum aktywności wykazano w drugiej dobie, o wartości 9 U/ml [25]. Natomiast w przypadku bakterii *Bacillus megaterium* wysoką aktywność keratynolityczną na poziomie 58 U/ml odnotowano w piątej dobie, co częściowo pokrywa się z badaniami własnymi. W tych samych badaniach zaobserwowano, że pióra odtłuszczone sterylizowane utylizowane były na poziomie 26%, natomiast ich odpowiednik niesterylizowany utylizowany był z mniejszym powodzeniem [26]. Suntornsuk badał degradację odtłuszczonych piór przez bakterie *B. subtilis* FK 46, wykazał maksymalną aktywność keratynolityczną 0,9 U/ml [27]. W swoich badaniach Haddar i wsp. wykorzystując rekombinowany szczep wskazali duże aktywności enzymów proteolitycznych i keratynolitycznych oraz wysoki poziom wolnych grup aminowych [28]. Glebawy izolat bakterii *B. pumilus* wykazywał wysoką hydrolizę piór na poziomie 97% i zawartość białka 4,7 mg/ml, aktywność proteaz 361,8 U/ml, jednak proces odbywał się na piórach odtłuszczonych i mytych [29]. Natomiast w prezentowanych badaniach, ubytek masy w hodowli inokulowanej wynosił 68,3%, co udowadnia, że w tak trudnych warunkach pióra natywne, nie odtłuszczane, bakterie *B. subtilis* B172 były wysoce aktywne i skuteczne. W odpowiedniku nieinokulowanym aktywność mikroflory epifitycznej była o połowę mniejsza.

W przeprowadzonych badaniach maksymalna ilość grup thiolowych, będąca wynikiem aktywności proteaz wynosiła

0,109 mM, w czwartej dobie. W swoich badaniach Ghosh i wsp. dowiódł, że w procesie degradacji pierza ilość grup thiolowych w siódmej dobie hodowli była na poziomie 0,3 mM. W licznych doniesieniach zwraca się uwagę na fakt, że redukcja wiązań disiarczkowych prowadzonych przez reduktazę disiarczkową powiązana jest z keratynolizą [30]. Czyste enzymy często nie są w stanie prowadzić degradacji pierza. To pokazuje, że przed degradacją potrzebna jest redukcja grup sulfhydrylowych. Dlatego często preparaty enzymatyczne są mało skuteczne i nie są w stanie przeprowadzić degradacji pierza, gdyż tak jak w tym przypadku, przed procesem potrzebna jest redukcja grup disiarczkowych. Dlatego istotny jest udział komórek mikroorganizmów, mających szeroki wachlarz enzymatyczny. Dowodem na to są badania Tiquia 2005, który stosował inokulum do kompostów keratynowych i wykazał, że zwiększyło ono poziom kompostowania piór, przy mało zróżnicowanym profilu mikroorganizmów w kompoście inokulowanym w porównaniu z nieinokulowanym [31]. Podobnie w badaniach Wierzby, dodatek inokulum do kompostu odpadów organicznych zintensyfikował proces biodegradacji. Większa była aktywność bakteryjna i związana z nim aktywność innych enzymów (proteolitycznych, lipolitycznych, celulolitycznych) [32].

Podsumowanie

Przeprowadzone badania wskazują możliwość wykorzystania bakterii z rodzaju *Bacillus* do degradacji pierza kurzego. Zastosowana szczepionka bakterii tworzących biofilmy w znacznym stopniu przyspiesza i intensyfikuje proces dekompozycji pierza.

Szczepionki bakterii mogą mieć zastosowanie w utylizacji pierza natywnego. Dzięki pominięciu skomplikowanych metod odtłuszczania i mycia piór, możliwe jest wykorzystanie szczepionek bakterii zarówno w skali półtechnicznej oraz większej technicznej

Literatura

- [1.] A. GRAZZIOTIN, F.A. PIMENTEL, E.V. JONG, A. BRANDELLI: *Nutritional improvement of feather protein by treatment with microbial keratinase*, Animal Feed Science and Technology 2006, Vol. 126, pp. 135-144.
- [2.] DANIEL J. DAROIT, A. P. F. CORREIA, A. BRANDELLI: *Keratinolytic potential of a novel Bacillus sp. P45 isolated from the Amazon basin fish Piaractus mesopotamicus*, International Biodeterioration & Biodegradation 2009, Vol. 63, pp. 358-363.
- [3.] R. GUPTA, P. RAMNANI, *Microbial keratinases and their prospective applications: an overview*. Appl Microbiol Biotechnol 2006, Vol.70. pp. 21-33.
- [4.] A. RODZIEWICZ, W. ŁABA: *Keratyny i ich biodegradacja*, Biotechnologia 2006 vol. 2 nr 73, ss. 130-147.
- [5.] J. M. ICHIDA, L. KRIZOVA, A. LEFEVRE, H. M. KEENER, D. ELWELL, JR. E. H. BURTT: *Bacterial inoculum enhances keratin degradation and biofilm formation in poultry compost*. Journal of Microbiological Methods 2001, Vol. 47, pp. 199-208.
- [6.] C. CAI, B. LOU, X. ZHENG: *Keratinase production and keratin degradation by a mutant strain of Bacillus subtilis*, Journal of Zhejiang University 2007, Vol. 9 No.1, pp. 60-67.
- [7.] E. VASILEVA-TONKOWA, A. GOUSTEROVA, G. NESHEV: *Ecologically safe method for improved feather wastes biodegradation*. International Biodeterioration & Biodegradation 2009, Vol. 63, pp. 1008-1012.
- [8.] C. BERNAL, J. CAIRÓ, N. CELLO: *Purification and characterization of a novel exocellular keratinase from Kocuria rosea*. Enzyme and Microbial Technology 2006 Vol. 38, pp. 49-54.
- [9.] A. BRANDELLI, D.J. DAROIT, A. RIFFEL: *Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications*, Appl. Microbiol. Biotechnol 2010, Vol. 85, pp. 1735-1750.

- [10.] A. RODZIEWICZ, K. BARANOWSKA, W. ŁABA, J. SOBOLCZYK: *Właściwości keratynolityczne oraz tworzenie biofilmu przez bakterie Bacillus subtilis*. Biotechnologia 2006, vol. 5 nr 1-2, ss. 61-73.
- [11.] J. P. M. LANGEVELD, J.-J. WANG, D. F. M. VAN DE WIEL, G. C. SHIH, G. J. GARSSSEN, A. BOSSERS, J. C. H. SHIH: *Enzymatic Degradation of Prion Protein in Brain Stem from Infected Cattle and Sheep*. The Journal of Infectious Diseases 2003, Vol. 188, pp. 1782-1789.
- [12.] E. TIWARY, R. GUPTA: *Rapid conversion of chicken feather to feather meal using dimeric keratinase from Bacillus licheniformis ER-15*. J. Bioprocess. Biotech 2012., Vol. 2, nr 123
- [13.] J.L. Giogno, F.S. Lucas, F. Casarin, P. Heeb, A. Brandelli: *Keratinolytic proteases of Bacillus species isolated from the Amazon basin showing remarkable de-hairing activity*. World J Microbiol Biotechnol 2007, Vol. 23, pp. 375-382.
- [14.] H.-J. SON, H.-C. PARK, H.-S. KIM: *Nutritional regulation of keratinolytic activity in Bacillus pumilus*. Biotechnol Lett 2008, Vol. 30, pp. 461-465.
- [15.] P. PILLAI, G. ARCHANA: *Hide depilation ad feather disintegration studiem with keratinolytic serie protease from a novel Bacillus subtilis isolate*. Appl. Microbiol. Biotechnol 2008, Vol. 78, pp. 643-650.
- [16.] WEI-HUA CHU: *Optimization of extracellular alkaline protease production from species of Bacillus*. J Ind Microbiol Biotechnol 2007, Vol. 34, pp. 241-145.
- [17.] M.C. VARGAS –GARCÍA, M.J. LÓPEZ, F. SUÁREZ, J. MORENO: *Laboratory study of inocula production for composting processes*. Bioresource Technology 2005, Vol. 96, pp. 797-803.
- [18.] K. WAWRZKIEWICZ, J. ŁOBARZEWSKI, T. WOLSKI: *Intracellular keratinase of Trichophyton gallinae*. Journal of Medical and Veterinary Mycology 1987, vol. 25, ss. 261-268.
- [19.] O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR, R. J. RANDALL: *Protein measurement with the Folin – Phenol reagent*. J. Biol. Chem. 1951, Vol. 193, pp. 256 – 275.
- [20.] CH. K. RIENER, G. KADA, H. J. GRUBER: *Quick measurement of protein sulfhydryls with Ellman's reagent and with 4,4'- dithiodipyridine*. Anal Bioanal Chem. 2002, Vol. 373, pp. 266 – 276.
- [21.] S. L. SNYDER, P. Z. SOBOCINSKI: *An Improved 2,4,6 – trinitrobenzenesulfonic amid method for the determination of Amines*. Analytical Biochemistry 1975, vol. 64, pp. 284 – 288.
- [22.] M. L. J. ANSON. Gen. Physiol. 1939, Vol. 22, pp. 79.
- [23.] P.O. WERLANG, A. BRANDELLI: *Characterization of a Novel Feather-Degrading Bacillus Strain*. Applied Biochemistry and Biotechnology 2005, Vol. 20, pp. 71-79.
- [24.] A. GESSESSE, R. HATTI-KAUL, B.A. GASHE, B. MATTIASSON: *Novel alkaline proteases from alkaliphilic bacteria grown on chicken feather*. Enzyme and Microbial Technology 2003, Vol. 32, pp. 519-524.
- [25.] A. RIFFEL, A. BRANDELLI: *Keratinolytic Bacteria Isolated from feather waste*. Brazilian Journal of Microbiology 2006, Vol. 37, pp. 395-399.
- [26.] G-T. PARK, H-J. SON: *Keratinolytic activity of Bacillus megaterium F7-1, a feather-degrading mesophilic bacterium*. Microbiological Research 2009, Vol. 164, pp. 478-485.
- [27.] W. SUNTORNSUK, L. SUNTORNSUK: *Feather degradation by Bacillus ssp. FK 46 in submerged cultivation*. Biore-source Technology 2005, Vol. 86, pp. 239 – 243.
- [28.] O.H. HADDAR, T.I. ZAGHLOUL, H.M. SAEED: *Biodegradation of native feather keratin by Bacillus subtilis recombinant strains*. Biodegradation 2009, Vol. 20, pp. 687-694.
- [29.] H.A. EL-REFAI, M.A. NABY, A. GABALLA, M.H. EL- ARABY, A.F.A. FATTAH: *Improvement of the newly isolated Bacillus pumilus FH9 keratinolytic activity*. Process Biochemistry 2005, Vol. 40, pp. 2325- 2332.
- [30.] A. GHOSH, K. CHAKRABARTI, D. CHATTOPADHYAY: *Degradation of raw feather by novel high molecular weight extracellular protease from newly isolated Bacillus cereus DCUW*. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2008, Vol. 35, pp. 825-834.
- [31.] S.M. TIQUIA, J.M. ICHIDA, H.H. KEENER, D.L. ELWELL, E.H. BURTT, F.C. MICHEL: *Bacterial community profiles on feathers during composting as determined by terminal restriction fragment length polymorphism analysis of 16S rDNA genes*. Appl. Microbiol Biotechnol 2005, Vol. 67, pp. 412-419.
- [32.] S. WIERZBA, M. NABDRALIK: *Biocomposite for organic waste degradation*. Physicochemical Problems of Mineral Processing 2005, vol. 39, ss. 249-256.