

# Mikrobiologické využitie odpadov poľnohospodárstva

663.14.031.32

Ing. DARIA LONGAUEROVÁ, CSc., Doc. Ing. DUŠAN HALAMA, CSc., Chemickotechnologická fakulta SVŠT, Bratislava, Katedra technickej mikrobiológie a biochémie

## I. Štúdium inhibítorov v hydrolyzátoch

Fermentačný priemysel pri produkcii mikrobiálnych bielkovín sa orientuje na nové netradičné suroviny a snaží sa tiež využívať suroviny odpadného charakteru. Potencionálne dostupnými surovinami, ktoré by spĺňali tieto kritériá, sú hydrolyzáty a predhydrolyzáty lignocelulózového odpadu, odpad z výroby celulózy alkalickým spôsobom a hydrolyzáty exkrementov zo živočíšnej výroby. Snaží sa takto riešiť otázku nedostatku kŕmnych bielkovín a zároveň i otázku likvidácie odpadu, ktorý zafažuje životné prostredie.

Mikrobiologické spracovanie odpadov (vedľajších surovín) obsahujúcich lignocelulózový materiál je možné viacerými spôsobmi:

a) enzymatická hydrolýza s nasledovnými kultiváciami alebo fermentáciami,

b) výroba zmesného krmiva kultiváciou celulólytických mikroorganizmov samotných alebo v zmesi s inými,

c) kyslá hydrolýza a kultivácia rozličných mikroorganizmov.

Posledný postup je najrozšírenejší (ZSSR) a okrem dreva, slamy ap. sa odskúšal aj na odpadoch živočíšnej výroby.

Pri hydrolýze lignocelulózových materiálov vzniká pestrá paleta látok, ktoré inhibične pôsobia na rast produkčnej kultúry. Sú to predovšetkým fural, hydroxymetyl-fural, prchavé mastné kyseliny, látky koloidného charakteru a soli ťažkých kovov.

V našej práci sme sa zaoberali predovšetkým kyslým hydrolyzátom prasačích exkrementov. Pri pokusoch o produkciu biomasy na tomto substráte kvasinkovitými mikroorganizmami sme narazili na viaceré ťažkosti. Ukázalo sa, že za bežných kultivačných podmienok nie je možná produkcia SCP žiadnou zo skúmaných kultúr bez riedenia hydrolyzátu alebo bez jeho úpravy aktívnym uhlím. Zistili sme, že dodávané hydrolyzáty veľmi kolísali v analytických hodnotách, čo značne ovplyvňovalo rast kultúr. Navyše po úprave hydrolyzátu aktívnym uhlím rast kultúr *Candida* sp. bol pomerne dobrý, ale v tančiku za neaseptických podmienok dochádzalo ku silnej kontaminácii baktériami aj pri udržiavaní pH 4,5.

Naším cieľom bolo získať vhodnú kultúru pre rast na hydrolyzátoch prasačích exkrementov, zistiť vhodné kultivačné podmienky na tomto substráte a preskúmať inhibičný účinok hydrolyzátoch na kvasinky i na baktérie. Pre neštandardnosť hydrolyzovaného materiálu testovanie sme robili na modelových pôdach. Z možných inhibítorov sme testovali kyselinu mravčiu, kyselinu propionovú a fural. Inhibičný účinok sme vyjadrili dĺžkou lag fázy a priemernou špecifickou rastovou rýchlosťou v logaritmickú fázu. Orientačne sme skúšali i rast nami izolovanej kultúry na iných druhoch hydrolyzátoch lignocelulózového materiálu.

## EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

### Materiál a metódy

#### Mikroorganizmy

V prvej etape práce sme testovali niekoľko kultúr kvasníc, prevažne rodu *Candida*, zo zbierky Chemického ústavu SAV. Rástli však len na zriedených hydrolyzátoch alebo upravených aktívnym uhlím a väčšina

z nich po niekoľkonásobnom preočkovaní na tomto substráte stratila schopnosť rasti na ňom.

*Candida tropicalis* 78 — bola nami získaná nahromadovacou metódou [1] a identifikovaná na CHÚ SAV. U tejto kultúry sme zistili, že má trvalú schopnosť rasti i na hydrolyzátoch bez odstránenia inhibítorov, pričom rýchlosť rasti je vyššia pri pH 6 než pri pH 4,5. Pri pH 6 i za neaseptických podmienok bola pozorovaná len veľmi nízka bakteriálna kontaminácia.

Bakteriálne kmene pochádzali jednak zo zbierky katedry a tiež niektoré boli nami izolované z hydrolyzátoch a modelových pôd.

B-III — tyčinková bakteriálna kultúra bližšie neurčená, bola získaná ako kontaminant modelovej pôdy. Po predbežných testoch bola vybraná ako modelová bakteriálna kultúra.

Kvasinky boli udržiavané na sladinkovom agare a baktérie na mäsopeptónovom agare.

#### Pôdy

Kyslý hydrolyzátny prasačích exkrementov pochádzal z pokusnej poloprevádzky Veľkovýkrmní v Bílove a bol dodávaný bez neutralizácie.

#### Zloženie hydrolyzátnu:

sušina: pred úpravou	58,1 g.l <sup>-1</sup>
po úprave	34,8 g.l <sup>-1</sup>
redukujúce látky	15,4 g.l <sup>-1</sup>
dusík	11,7 g.l <sup>-1</sup>
fosfor	1,0 g.l <sup>-1</sup>

#### Úprava hydrolyzátnu

Hydrolyzátny sa zahreje na 80 °C a neutralizuje sa s Ca(OH)<sub>2</sub> alebo NaOH na pH 4,5 alebo pH 6 a prefiltruje sa. Pri úprave aktívnym uhlím sa pridá aktívne uhlie a zahreje sa na 80 °C po dobu 30 minút a prefiltruje sa.

#### Modelová pôda

Minerálna DMA pôda podľa PIRTA [2]:

10 g.l <sup>-1</sup> glukóza,
15 g.l <sup>-1</sup> arabinóza,
4 % obj. kvasničný hydrolyzátny,
pH 4,5 alebo pH 6.

#### Príprava kvasničného hydrolyzátnu

50 g pekárského droždia doplní sa do 250 ml s 3% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Hydrolyzuje sa 10 minút pri 120 °C. Potom sa neutralizuje s NaOH, prefiltruje a sterilizuje.

#### Inhibítory

Kyselina mravčia (KM), kyselina propionová (KP) a fural (F) v koncentráciách uvedených pri jednotlivých pokusoch.

Inhibičný účinok sme vyjadrili dĺžkou lag fázy rastu [3], priemernou špecifickou rastovou rýchlosťou  $\mu$  — napriek tomu, že v niektorých prípadoch sa rast mikroorganizmov dal dobre modelovať krivkou logistického rastu [4], v našich pokusoch bolo možné v prvej časti rastu využiť exponenciálnu závislosť. Tiež v niektorých prípadoch sme inhibičný účinok vyjadrili i výťažkom biomasy a pri prídavky inhibítora v logaritmickú fázu rastu i fázou zdržania rastu a priemernou špecifickou rastovou rýchlosťou po fáze zdržania rastu.

#### Kultivácia

Kultivačné pokusy sme robili v skúmavkách s 5 ml pôdy na minitrepačke pri teplote 28 °C.

Sledovaná dĺžka kultivácie u *C. tropicalis* bola 60 hodín a u baktérií 26 hodín.

### VÝSLEDKY A DISKUSIA

Vplyv inhibítorov sme sledovali od koncentrácií  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$  až  $3 \cdot 10^{-2} \text{ mol.l}^{-1}$  na baktérie i na kvasinky. Inhibítory sme pridávali na začiatku rastu ako i v logaritmickú fázu. Vplyv sledovaných kyselín sa v nižších koncentráciách, a to jednotlivo ako i v kombináciách, výrazne neprejavil. Kombinácie vysokých koncentrácií spôsobili buď úplnú inhibíciu alebo značné predĺženie lag fázy.

Na základe výsledkov predbežných pokusov, vybrali sme určité koncentrácie inhibítorov (približne také ako v hydrolyzátoch) a vplyv týchto sme sledovali na modelových kultúrach.

Tabuľka 1. Vplyv inhibítorov na *C. tropicalis* 78 pridaných na začiatku rastu

Inhibítory [mmol.l <sup>-1</sup> ]			lag fáza [h]		$\mu$ [h <sup>-1</sup> ]		Biomasa [g.l <sup>-1</sup> ]	
KM	KP	F	pH 4,5	pH 6	pH 4,5	pH 6	pH 4,5	pH 6
0	0	0	4	4	0,10	0,13	1,80	1,80
80	0	0	5	4	0,08	0,12	1,26	1,60
0	12	0	6	4	0,08	0,12	0,86	1,60
0	0	12	37	17	0,08	0,09	0,48	0,86
0	0	1,2	4	4	0,08	0,13	1,2	1,86
0	0	6	16	16	0,11	0,13	0,90	0,90
80	12	0	11	4	0,10	0,12	1,25	1,60
80	0	1,2	7	4	0,12	0,13	1,80	1,80
80	0	6	21	16			0,90	1,00
0	12	1,2	11	4	0,90	0,11	0,66	1,60
0	12	6	28	17			0,40	1,00

Tabuľka 2. Vplyv inhibítorov na B-III pridaných na začiatku rastu

Inhibítory [mmol.l <sup>-1</sup> ]			lag fáza [h]	$\mu$ [h <sup>-1</sup> ]
KM	KP	F	pH 6	pH 6
0	0	0	4	0,60
80	0	0	8	0,45
0	12	0	13	0,45
0	0	12	15	0,45
0	0	1,2	4	0,42
0	0	6	14	0,40
80	12	0	21	0,50
80	0	1,2	8	0,16
80	0	6	12	0,23
26	0	1,2	13	0,41
26	0	6	16	0,45
80	12	1,2	23	0,51
80	12	6	33	0,29
80	36	0	úplná inhibícia	

Z výsledkov uvedených v tabuľke 1 vidieť, že vyšší inhibičný účinok sledovaných látok na kvasinky je pri pH 4,5 vyšší než pri pH 6 a prejavuje sa najmä predĺžením lag fázy a tiež vo väčšine prípadov i zníženou rýchlosťou rastu. Vplyv inhibítorov je výraznejší i na výťažok biomasy kvasiniek pri pH 4,5. Kyseliny i fural znížujú výťažky biomasy.

U baktérií je vplyv testovaných látok pri pH 6 veľmi výrazný (tabuľka 2) a prejavuje sa najmä predĺžením lag fázy a tiež znížením špecifickej rastovej rýchlosti. Výťažky biomasy boli podstatne menej ovplyvnené v porovnaní s kvasinkami.

Veľmi výrazný účinok na predĺženie lag fázy bol na-

Tabuľka 3. Vplyv inhibítorov na bakteriálne kmene pridaných na začiatku rastu

Inhibítory [mmol.l <sup>-1</sup> ]			Mikroorganizmy	lag fáza [h]	
KM	KP	F		[h]	$\mu$ [h <sup>-1</sup> ]
80	12	0	B. subtilis (B)	úplná inhibícia	
80	12	0	B. subtilis (K)	14	0,10
80	12	0	P. fluorescens	23	0,11
80	12	0	P. ovalis	24	0,09
80	12	6	B. subtilis (B)	úplná inhibícia	
80	12	6	B. subtilis (K)	45	0,06
80	12	6	P. fluorescens	úplná inhibícia	
80	12	6	P. ovalis	45	0,10
0	0	0	B. subtilis (B)	5	0,34
0	0	0	B. subtilis (K)	3	0,25
0	0	0	P. fluorescens	5	0,11
0	0	0	P. ovalis	10	0,18

Tabuľka 4. Vplyv inhibítorov na *C. tropicalis* 78 pridaných v logaritmickú fázu rastu

Inhibítory [mmol.l <sup>-1</sup> ]			Fáza zdr. rastu [h]		$\mu$ [h <sup>-1</sup> ]	
KM	KP	F	pH 4,5	pH 6	pH 4,5	pH 6
0	0	0	0	0	0,10	0,13
80	0	0	8	0	0,10	0,13
0	12	0	9	0	0,06	0,11
0	36	0	9	0	0,02	0,11
0	0	6	0	0	0,06	0,07
80	12	0	9	0	0,02	0,12
80	36	0	9	0	0,01	0,07
80	12	6	9	0	0,02	0,06

Tabuľka 5. Vplyv inhibítorov na B-III pridaných v logaritmickú fázu rastu

Inhibítory [mmol.l <sup>-1</sup> ]			Fáza zdr. rastu [h]	$\mu$ [h <sup>-1</sup> ]
KM	KP	F	pH 6	pH 6
0	0	0	0	0,60
80	0	0	0	0,32
0	12	0	0	0,30
0	36	0	4	0,24
0	0	6	0	0,28
80	12	0	1	0,38
80	36	0	5	0,31
80	12	6	3	0,28

jmä u kombinácie 80 mmol.l<sup>-1</sup> kyseliny mravčej a 12 mmol.l<sup>-1</sup> kyseliny propiónovej. Vplyv tejto kombinácie inhibítorov sme sledovali i na iné zbierkové bakteriálne kmene (tabuľka 3) pri pH 6.

Vplyv testovanej kombinácie inhibítorov bol veľmi výrazný i na iné bakteriálne druhy. S prídavkom furalu sa inhibičný účinok podstatne zvýšil. Citlivosť testovaných mikroorganizmov na inhibítory bola rôzna — v niektorých prípadoch došlo k úplnej inhibícii rastu.

Po pridaní testovaných inhibítorov v logaritmickú fázu rastu u kvasiniek (tabuľka 4) boli pomerne veľké rozdiely účinku všetkých sledovaných koncentrácií inhibítorov vzhľadom na sledované hodnoty pH, a to:

a) u pH 4,5 výrazná fáza zdržania rastu,

b) znížená rastová rýchlosť — predovšetkým u pH 4,5. Veľmi výrazný bol tiež vplyv kombinácie kyseliny mravčej a kyseliny propiónovej na špecifickú rastovú rýchlosť pri pH 4,5. Podobne ako pri prídavku inhibítorov na

začiatku rastu, boli i v prípade ich pridania v logaritmickú fázu rastu ovplyvnené i hodnoty nárastu biomasy pri pH 4,5. Pri pH 6 bol tento vplyv na hodnoty biomasy nepatrný.

U baktérií, ako to vidieť z tabuľky 5, inhibítory predovšetkým znižovali špecifickú rastovú rýchlosť a len v niektorých koncentráciách spôsobili i zdržanie rastu. Vplyv na nárast biomasy bol nepatrný.

#### Literatúra

- [1] HALAMA, D. et al.: Výskum využitia netradičných surovín na výrobu bielkovinových krmív. Bratislava, ČHTF SVŠT, 1979, 75 s. (prieběžná správa k úlohe S-11-529-056/02/)
- [2] PIRT S. J.: A kinetic study of the mode of growth of surface colonies of bacteria and fungi. J. Gen. Microbiol. 47, 1967, 181
- [3] SKYTA, D.: Metody technické mikrobiologie. SNTL, Praha 1978
- [4] JAROVENKO, V. L. - ROVINSKIĬ, L. A.: Modelirovanije i optimizacija mikrobiologičeskich processov spirtovovo proizvodstva. Piščevaja promyšlenost', Moskva 1978
- [5] LONGAUEROVÁ, D. - HALAMA, D.: Štúdium inhibičného vplyvu kyslých hydrolyzátov na mikroorganizmy. XII. výročná konferencia o kvasinkách, Smolenice 1980

**Longauerová, D. - Halama, D.: Mikrobiologické využitie odpadov poľnohospodárstva. I. Štúdium inhibítorov v hydrolyzátach.** Kvas. prům., 27, 1981, č. 4, s. 90—92.

Z dosiahnutých výsledkov vyplýva, že nami testované inhibítory majú značný podiel na rozdielnej rýchlosti rastu *C. tropicalis* 78 pri pH 4,5 a pH 6. Inhibičný účinok kyselín a furalu je vyšší pri pH 4,5 než pH 6. I nízka kontaminácia baktériami pri raste kvasinky za neaseptických podmienok pri pH 6 sa dá vysvetliť ich účinkom — značne predĺžená lag fáza a znížená rastová rýchlosť u baktérií.

Kombinácie inhibítorov inhibičný efekt zvyšujú. Kombinácia 80 mmol.l<sup>-1</sup> kyseliny mravčej a 12 mmol.l<sup>-1</sup> kyseliny propiónovej sa ukázala zvlášť výhodná. Značne predĺžovala lag fázu u baktérií, zatiaľ čo u *C. tropicalis* 78 pri pH 6 lag fáza nebola ovplyvnená. Túto kombináciu by bolo možné využiť i ako vhodnú ochranu proti bakteriálnej kontaminácii.

**Микробиологическое использование отходов сельского хозяйства I. Исследование ингибиторов в гидролизатах.** Лонгауэрова, Д., Халяма, Д. Квас. прум. 27, 1981, № 4, стр. 90—92.

Исследованные ингибиторы в значительной степени оказывают влияние на разную скорость роста *C. tropicalis* 78 при pH 4,5 и pH 6. Также низкую контаминацию бактериями при росте дрожжевого грибка в неасептических условиях при pH 6 можно объяснить их действием значительно продленной лаг-фазы и пониженной скоростью роста бактерий.

Комбинации ингибиторов повышают ингибирующий эффект. Комбинация 80 ммол.л<sup>-1</sup> муравьиной кислоты и 12 ммол.л<sup>-1</sup> пропионовой кислоты оказалась особенно выгодной. Она значительно продолжала лаг-фазу бактерий, затем что в случае *C. tropicalis* 78 при pH 6 лаг-фаза была без изменений. Эту комбинацию можно было бы использовать и как подходящее средство для защиты от бактериальной контаминации.

**Longauerová, D. - Halama, D.: Microbiological Recovery of Agricultural Waste. I. Study of Inhibitors in Hydrolysates.** Kvas. prům., 27, 1981, No. 4, pp. 90—92.

The results obtained show, that the tested inhibitors influence strongly growth rates at pH 4,5 and 6 of *C. tropicalis* 78. Low bacterial contamination of the yeast growing under non aseptic conditions at pH 6 can be explained by their action — considerably prolonged lag phase and reduced growth rate of bacteria.

Combinations of inhibitors enhance the inhibitory effect. The combination of 80 mM formic acid and 12 mM propionic acid has been shown as particularly advantageous. It prolonged significantly the lag phase of bacteria while the lag phase of *S. tropicalis* 78 was not influenced at pH 6. This combination could be used as suitable protection from bacterial contamination.

**Longauerová, D. - Halama, D.: Mikrobiologische Ausnützung der landwirtschaftlichen Abfälle I. Studium der Inhibitoren in Hydrolysaten.** Kvas. prům., 27, 1981, No. 4, S. 90—92.

Aus den erzielten Ergebnissen geht hervor, daß die von den Autoren getesteten Inhibitoren einen markanten Einfluß auf die Änderungen der Wachstumsge­schwindigkeit der *C. tropicalis* 78 bei pH 4,5 und pH 6 haben. Auch die niedrige Kontamination durch Bakterien bei dem Wachstum der Hefe bei nichtaseptischen Bedingungen kann durch ihre Wirkung — die ziemlich verlängerte Lag-Phase und verminderte Wachstums­geschwindigkeit bei Bakterien — erklärt werden.

Die Inhibitionswirkung wird durch die Kombination der Inhibitoren erhöht. Als besonders vorteilhaft hat sich die Kombination von 80 mmol.l<sup>-1</sup> Ameisensäure und 12 mmol.l<sup>-1</sup> Propionsäure erwiesen. Diese Kombination verlängerte beträchtlich die Lag-Phase bei den Bakterien, wogegen bei *C. tropicalis* 78 bei pH 6 die Lag-Phase nicht beeinflußt wurde. Die erwähnte Kombination der Inhibitoren könnte auch als geeigneter Schutz gegen bakterielle Kontamination aus­enützt werden.