GREFF BABETT[1]

Nehezen komposztálható gyógynövény maradványok biológiailag aktív vegyületeinek hatása a lebontási folyamatot végző főbb mikroorganizmusokra

1. BEVEZETÉS

A mezőgazdasági melléktermékekre magas lignocellulóz tartalom jellemző, aminek biotranszformációja egy időigényes, bonyolult procedúra,[2] éppen ezért ezen, nagy mennyiségű, a talaj számára is fontos tápanyagot tartalmazó hulladékok kezelése mára már társadalmi kihívássá vált,[3] mivel kezeletlenül alkalmatlanok a közvetlen felhasználásra. Éppen ezért a komposztálás az egyik legjobb opciónak tekinthető a szerves, szilárd hulladékok mezőgazdaságban történő alkalmazására.[4]

A komposztálandó nyersanyagokban is nagy mennyiségben előforduló cellulóz egy biológiailag megújuló energiaforrás,[5] ami sokféle cellulózbontó mikroorganizmus (gombák, baktériumok) számára szolgál szénforrásként. Cellulózbontó gombák közé tartozik többek között a *Trichoderma*, *Fusarium*, *Penicillium* és az *Aspergillus* törzsek, míg a főbb cellulózbontó baktérium nemzetségek a *Cellvibrio*, *Cellfalcicula*, *Cellulomonas*, *Cytophaga*, *Pseudomonas* és a *Bacillus*. Anaerob körülmények között a *Clostridium* genusz fajai képesek a cellulóz bontására.[6]

Mivel a komposztálási eljárásokat egyre növekvő érdeklődés övezi, az alkalmazott technológiák folyamatosan fejlődnek. Normális esetben a komposztálás

[1] SZE Wittmann Antal Növény-, Állat- és Élelmiszer-tudományi Multidiszciplináris Doktori Iskola, PhD-hallgató. Témavezető: Prof. Dr. Szigeti Jenő, SZE Mezőgazdaság- és Élelmiszertudományi Kar, Élelmiszertudományi Tanszék, professor emeritus.

[2] Jurado, Macarena Del Mar – Suárez-Estrella, F. – Vargas-García, M. C. – López, Maria J. – López-González, Juan Antonio – Moreno, Joaquin: Increasing native microbiota in lignocellulosic waste composting: Effects on process efficiency and final product maturity, in *Process Biochemistry,* 2014, no. 49., pp. 1958–1969.

[3] Singh, Deepika – Suthar, Surindra: Vermicomposting of herbal pharmaceutical industry waste: Earthworm growth,plant-available nutrient and microbial quality of end materials, in *Bioresource Technology*, 2012, no. 112., pp. 179–185.

[4] Ahmad, Rizwan – Jilani, Ghulam – Arshad, Muhammad – Zahir, Zahir A. – Khalid, Azeem: Bio-conversion of organic wastes for their recycling in agriculture: an overview of perspectives and prospects, in *Annals of Microbiology*, 2007, no. 57., pp. 471–479.

[5] Islam, Farjana – Roy, Narayan: Screening, purification and characterization of cellulase from cellulase producing bacteria in molasses, in *BMC Research Notes*, 2018, no. 11., https://doi.org/10.1186/s13104-018-3558-4.

[6] Krishna, M. P. – Mohan, Mahesh: Litter decomposition in forest ecosystems: a review, in

szintén egy munka- és időigényes folyamat, azonban ma már számos technológia áll rendelkezésünkre, amik elősegítik a komposztálási folyamatok gyorsabb lefolyását.[7] Ilyen lehetőség a komposztálást gyorsító, segítő mikrobiológiai készítmények alkalmazása is, melyek jelentős mértékben hozzájárulhatnak a komposztálási folyamat gyorsításához, illetve a lebomlás mértékének növeléséhez. Ezért kulcsfontosságú jelentőséggel bír a megfelelő és hatékony, komposztálást segítő mikrobatörzsek kiválasztása.

Mivel az extrakciós eljárásokból visszamaradó gyógynövényi hulladékok nehezen komposztálható anyagnak számítanak, ezért vizsgálataim során célom volt annak a meghatározása, hogy nagy tömegű, hagyományosan komposztálható adalékokkal (szarvasmarhatrágya, szalma) eliminálható-e a gyógynövényekből visszamaradó drogok cellulózbontó mikroorganizmusok szaporodására és anyagcseréjére gyakorolt gátló hatása. Mivel a komposztálás normál körülmények között egy igen időigényes folyamat, célom volt még annak a meghatározása is, hogy a forgalomban kapható komposztálást gyorsító, mikrobiológiai készítmény hatással van-e a komposztálás idejére. A kapott, illetve az irodalmi adatok alapján további célul tűztem ki egy saját komposztálást gyorsító mikrobiológiai készítmény kialakítását is, ami hatékonyan alkalmazható magas cellulóztartalmú hulladékok esetében, azonban ehhez elengedhetetlen az adott törzsek (*Cellulomonas*) szaporodási kinetikájának az ismerete.

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

2.1. Komposztálás során felhasznált nyersanyagok

A komposztálandó anyagkeverék extrakcióból visszamaradó növényi maradékokból (60%), szarvasmarhatrágyából (30%) és őszi árpa szalmából (10%) állt. Minden alapanyagot a Kisalföldi Mezőgazdasági ZRt. szolgáltatott. Az EM 1 jelű depóban lévő kísérleti komposzthoz az elővizsgálatok során legjobban teljesítő, komposztálást segítő mikrobiológiai adalékanyagot, az EM 1 mikrobiológiai törzsoldatot kevertem hozzá megfelelő mennyiségben.

2.2. A kísérletek beállítása és mintavételi eljárás

A félüzemi komposztálási kísérletek lebonyolítása a Kisalföldi Mezőgazdasági ZRt. munkatársainak közreműködésével történt Nagyszentjánoson. A komposzt befogadására kialakított depók oldallapjai raklapokból készültek, magasságuk és

---

Energy, Ecology and Environment, 2017, no. 4., pp. 236–249.

[7] Gabhane, Jadish – William, Spm. Prince – Bidyadhar, Rajnikant – Bhilawe, Priya – Anand, Duraisamy – Vaidya, Atul N. – Wate, Satish R.: Additives aided composting of green waste: Effects on organic matter degradation, compost maturity, and quality of the finished compost, in *Bioresource Technology*, 2012, no. 114., pp. 382–388.

hosszúságuk is 1-1 m volt. Alulról és felülről vastag fólia határolta a komposztot, míg oldalról légáteresztő háló burkolatot kaptak a depók. Egy-egy depóba körülbelül 300 kg előre bekevert komposztálandó anyag került. A kontroll depó összetétele makrokomponensek vonatkozásában ugyanaz volt, mint a EM-1 jelűé, de nem tartalmazott komposztálást segítő mikrobiológiai készítményt (1. táblázat). A bekevert kiindulási anyag hőmérséklete 34,3-36,5 °C, nedvességtartalma pedig 63,5-65,7 % körüli volt.

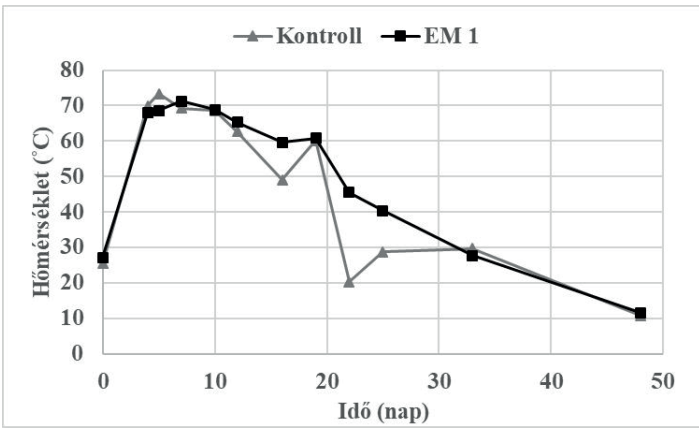
1. táblázat: Kialakított depók jelölése, összetétele és az alkalmazott adalék neve

Depó jelölése	Depókba kerülő anyag összetétele	Hozzáadott adalék
K (kontroll)	Növényi présmaradvány (360 kg), szarvasmarhatrágya (180 kg), őszi árpa szalma (60 kg) + 20 l víz	-
EM 1		EM 1 (0,4 l)

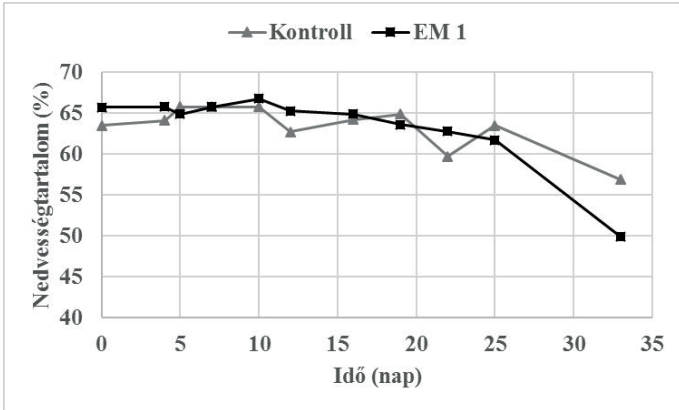
2018. október 4. és 2018. november 20. között összesen öt mintavétel történt. Az elvégzendő mikrobiológiai vizsgálatokhoz mintavételi pontokat jelöltem ki a depókban. A 0. napon, az 1., 2, 4. és 7. héten a két komposztból reprezentatív mintákat vettem három mélységből. A mintavétellel egyidőben a komposzthalmok hőmérsékletének és szárazanyagtartalmának meghatározása is megtörtént (1. és 2. ábra).

1. ábra: A depók hőmérsékletének változása

2. ábra: A depók nedvességtartalmának alakulása



2.3. Mikrobiológiai vizsgálatok



A vett mintákból 10 g-ot Stomacher tasakba bemértem és 90 ml 0,85%(w/v) steril NaCl oldatot hozzáadva BagMixer 400 (Interscience, Franciaország) típusú laboratóriumi homogenizálóval egyneműsítettem, majd a kívánt mértékig tízszeres hígítási sorozatot készítettem. Az aerob és fakultatív anaerob cellulózbontó mikroorganizmusok számának meghatározása 10 g/L karboxi-metil-cellulózzal kiegészített Dubos salts táptalajon[8] történt, lemezöntéses módszerrel, három párhuzamos vizsgálatával. Az inkubáció 30 °C -on 120 óra volt.

2.4. Cellulózbontó baktériumok szaporodásának vizsgálata spektrofotométer segítségével

A további komposztálási kísérletek elvégzéséhez, előzetes irodalmi adatok alapján kiválasztott, komposztokban is előforduló cellulózbontó baktériumokat választottam ki, melyek a *Cellulomonas* genuszba tartoztak. A kiválasztott törzsek a *C. biazotea* NCAIM B.01385, a *C. fimi* NCAIM B.01386, *C. phragmiteti* NCAIM B.02303 és a *C. flavigena* NCAIM B.01383 voltak. Kísérleteim során a szaporodási kinetika meghatározásához 10 g/L karboxi-metil-cellulózzal kiegészített Dubos salts tápoldatot használtam. A cellulózbontó törzseket tartalmazó folyékony tápközegeket (150 mL) rázófürdőben (Model 676D, New Brunswick Scientific) tenyésztettem (30˚C, 120 rpm). A rázatott kultúrából rendszeres időközönként mintát vettem és lemezöntéses módszerrel meghatároztam a minták élősejtszámát, valamint Spectroquant Pharo 100 spektrofotométer segítségével megmértem a minták optikai denzitását 600 nm-en. Az élősejtszám meghatározásához szükséges lemezeket WTC-Binder típusú termosztátban 30˚C-on inkubáltam, 120 óráig.

[8] Rajoka, M. Ibrahim – Malik, Kauser A.: Cellulase pruduction by Cellulomonas biazotea cultured in media containing different cellulosic substrates, in *Bioresource Technology*, 1997, no. 59.,pp. 21–27.

2.5. Statisztikai értékelés

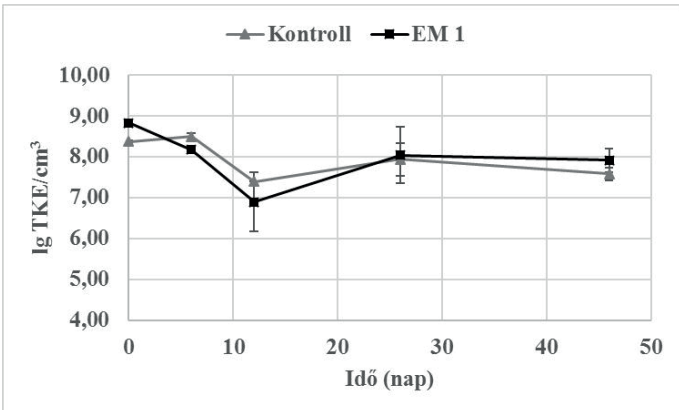
Méréseimet 1 ismétlésben, 3 mintavétellel végeztem el. Az ábrák elkészítéséhez Microsoft Excel 2016-os programot használtam.

3. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

3.1. Mikrobiológiai vizsgálatok eredményei

Az aerob és fakultatív anaerob cellulózbontó mikroorganizmusok számának alakulását a komposztálási kísérlet ideje alatt a 3. ábra szemlélteti. Ez alapján elmondható, hogy a mezofil cellulózbontó mikroorganizmusok döntő szerepet játszottak a gyógynövényhulladékot tartalmazó komposztálandó anyag átalakítása során, mivel csíraszámuk átlagosan 10^8 telepképző egységszám körül alakult. Aktivitásuk a komposztálás végéig viszonylag egyenletes volt mindkét kísérleti depóban, csak a komposztálás kezdeti időszakában (1-2. hét) volt érzékelhető jelentősebb aktivitás csökkenés, ami a hirtelen hőmérséklet emelkedésnek és a hosszabb termofil szakasznak tudható be. A legmagasabb cellulózbontó számot az EM 1 jelű depóban mértem a 0. napon, azonban ez a szám az első két hét során közel két nagyságrendnyit csökkent a magas hőmérsékletnek köszönhetően. A 7. héten mindkét komposztminta már csökkenő cellulózbontó aktivitást mutatott, ami arra is utalhat, hogy a komposztálandó anyagban lecsökkent ezen mikroorganizmusok által hasznosítható, szerves komponensek mennyisége. A kapott eredmények alapján, a kontroll és a beoltott komposzt mezofil cellulózbontószámának alakulását nézve, jelentős eltérésről nem számolhatok be.

3. ábra: A komposztok aerob és fakultatív anaerob cellulózbontó számának változása



3.2. Cellulózbontó baktériumok szaporodásának vizsgálata spektrofotométer segítségével

Mivel az előzetes komposztálási kísérleteink során a kereskedelmi forgalomban is kapható, komposzthoz adagolt komposztálást gyorsító mikrobiológiai készítmény nem gyakorolt jelentős hatást a komposztálási folyamatokra, ezért a kísérletek meggyorsításának érdekében kiválasztottam több cellulózbontó mikroorganizmust, melyek részt vehetnek lebontó és komposztálási folyamatokban,[9] illetve bizonyos törzsek megtalálhatók más komposztálást gyorsító készítményben is. A tenyésztési vizsgálatok során ezen baktériumok szaporodási kinetikáját vizsgáltam, hogy megállapítsam, a jövőbeni, tervezett gyógynövény-komposztálási kísérletek során mely *Cellulomonas* törzsek gyakorolhatnának pozitív hatást a komposztálás menetére, a végtermék minőségére és a komposztálási folyamat idejére. A vizsgálatok során a szaporodás intenzitását az optikai denzitás mérésével is meghatároztam, mivel a sejtszuszpenzió zavarossága vagy optikai denzitása közvetlenül összefügg a sejttömeggel/sejtszámmal, egy standard görbe elkészítése és kalibrálás után. E módszer előnye, hogy könnyen elvégezhető, valamint gyors és olcsó, azonban nem tesz különbséget élő és holt sejtek között,[10] kevésbé érzékeny, és csak bizonyos koncentráció intervallumban használható.[11] Mindazonáltal a hagyományos telepszámlálós módszerhez képest a vizsgálati időt jelentősen lecsökkenti, így a kalibrálás elvégzése után, későbbi mérések során az adott *Cellulomonas* törzseket tartalmazó tápoldatok sejtszáma közvetlenül meghatározható lesz.

A kapott eredmények alapján megállapítható, hogy a legtöbb vizsgált cellulózbontó törzs szakaszos szaporodási görbét mutatott. Ahogy az ábránkon is látható, a görbe kezdeti lappangó fázisainak hossza között azonban eltérések tapasztalhatók, ugyanis a *Cellulomonas phragmiteti* NCAIM B.02303 törzs egyáltalán nem mutatott lag fázist. A leghosszabb lappangási fázist a *Cellulomonas flavigena* NCAIM B.01386 törzs esetében mértem. A maximális telepképző egységszámot (TKE)

---

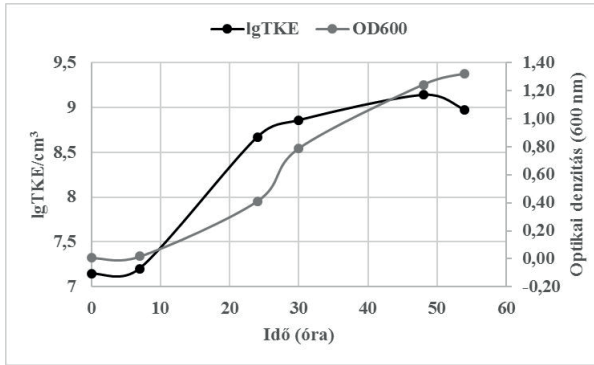
[9] Qian, Xun – Sun, Wei – Gu, Jie – Wang, Xiao-Juan – Zhang, Ya-Zun – Duan, Man-Li – Li, Hai-Chao – Zhang, Ran-Ran: Reducing antibiotic resistance genes, integrons, and pathogens in dairy manure by continuous thermophilic composting, in *Bioresource Technology*, 2016, no. 220., pp. 425–432., Wei, Huawei – Wang, Liuhong – Hassan, Muhammad – Xie, Bing: Succession of the functional microbial communities and the metabolic functions in maize straw composting process, in *Bioresource Technology*, 2018, no. 256., pp. 333–341., De Gannes, Vidya – Eudoxie, Gaius – Hickey, William J.: Prokaryotic successions and diversity in composts as revealed by 454-pyrosequencing, in *Bioresource Technology*, 2013, no. 133., pp. 573–580.

[10] Jarvis, Nathan A. – O'bryan, Corliss A. – Ricke, Steven C. – Johnson, Michael G. – Crandall, Philip G.: A review of minimal and defined media for growth of Listeria monocytogenes, in *Food Control*, 2016, no. 66., pp. 256–269.

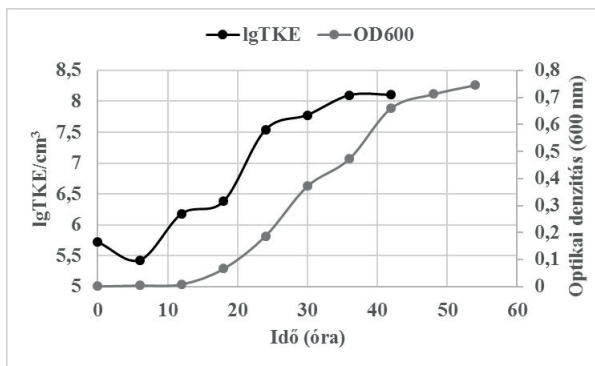
[11] Gabrielson, Jenny – Hart, Mark – Jarelöv, Anna – Kühn, Inger – Mckenzie, Douglas – Möllby, Roland: Evaluation of redox indicators and the use of digital scanners and spectrophotometer for quantification of microbial growth in microplates, in *Journal of Microbiological Methods*, 2002, no. 50., pp. 63– 73.

Cellulomonas biazotea, Cellulomonas fimi és *Cellulomonas phragmiteti* törzsek a vizsgálat 42., *Cellulomonas flavigena* pedig 48. órájában érte el (4-7. ábra). A legnagyobb telepképző egységszámot a *Cellulomonas flavigena* esetében mértem a 48. órában (10^9TKE/cm^3), azonban a másik három törzs maximális telepképző egységszáma 10^8 TKE körül alakult. Ténylegesen megállapítható, hogy a stacioner fázisban az elpusztult sejtekből még aktív enzimek szabadulnak fel, melyek feltehetőleg továbbra is kifejtik szerves anyagokra gyakorolt bontó aktivitásukat.

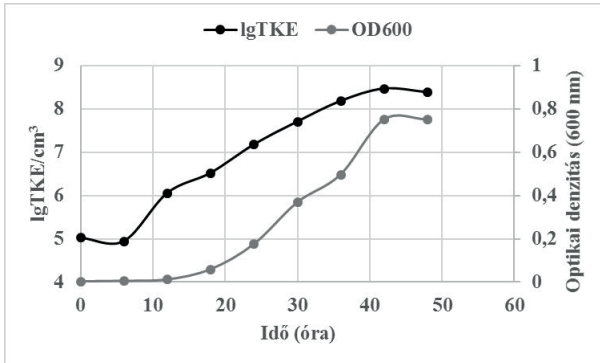
4. ábra: *Cellulomonas flavigena* (NCAIM B.01386) szaporodásának vizsgálata



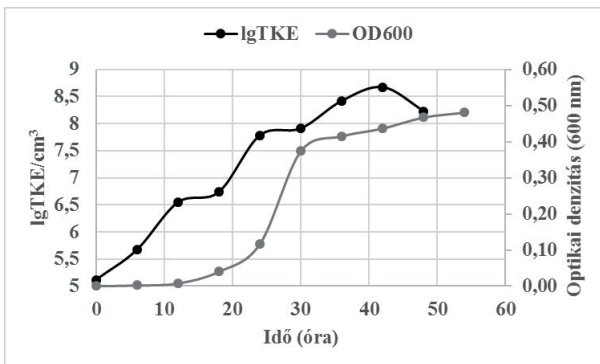
5. ábra: *Cellulomonas biazotea* (NCAIM B.01385) szaporodásának vizsgálata



6. ábra: *Cellulomonas fimi* (NCAIM B.01386) szaporodásának vizsgálata



7. ábra: *Cellulomonas phragmiteti* (NCAIM B.02303) szaporodásának vizsgálata



4. KÖVETKEZTETÉSEK

Vizsgálati eredményeim alapján elmondható, hogy a komposztálási eljárások alkalmasak a szarvasmarhatrágyával és szalmával kevert extrahálásból visszamaradt gyógynövény hulladékok hasznosítására. Az előzetes komposztálási kísérletek során kiválasztott komposztálást gyorsító mikrobiológiai készítmény (EM 1) nem befolyásolta jelentős mértékben a komposztálás kimenetelét a kontroll depóhoz képest.[12] Ez okból kifolyólag célul tűztem ki egy olyan cellulózbontó mikrobatörzs kiválasztását, mely nagyobb fajlagos szaporodási sebessége miatt intenzifikálhatja a komposztálódás folyamatát. A nagyszámú vizsgálat egyszerűsítésének érdekében összehasonlítottam a hagyományos lemezöntéses módszer

[12] Greff Babett – Varga Ágnes – Hanczné Lakatos Erika: Gyógynövények hatóanyagainak kinyerése után visszamaradt extrakciós maradványok komposztálhatóságának vizsgálata, in Szalka Éva (szerk.): *XXXVII. Óvári Tudományos Napok, 2018. november 9–10. Fenntartható agrárium és környezet, az Óvári Akadémia 200 éve – múlt, jelen, jövő*, 2018, Mosonmagyaróvár, 214–223. o.

és a turbidimetriai mikrobaszám meghatározás információtartalmát is. A kapott vizsgálati eredmények alapján az alábbi megállapítások tehetők:

Az optikai denzitás mérése révén nagyobb bizonyossággal meghatározhatók a vizsgált *Cellulomonas* törzsek szaporodási fázisai a hagyományos tenyésztéses eljárásokhoz képest (lag fázis, exponenciális és stacioner fázis). Annak ellenére, hogy az optikai denzitás meghatározásánál az élő- és holt sejteket is mérjük, mégis a tenyésztéses módszerekhez képest kisebb eltérésekkel jellemezhetjük a mikrobiológiai aktivitást, nemcsak a görbék meggyőzőbben „simább" futása miatt, hanem a mért időszakban a pusztulási sebesség még minimális volta miatt is. A szaporodási- és az optikai denzitás görbéjének ismeretében a további sejtszámmeghatározási és gátlóanyag vizsgálatok idő-, munka- és anyagigénye jelentősen lecsökken ezen törzsek tekintetében.

A vizsgált *Cellulomonas* törzsek, szaporodási képességeik alapján, alkalmasnak bizonyulhatnak egy komposztálást segítő mikrobiológiai adalékanyag elkészítéséhez. Azonban egy hatékony készítmény kialakításához még szükséges további mezofil és termofil baktériumtörzsek szaporodási kinetikájának, illetve ezen baktériumok cellulózbontó aktivitásának és gyógynövényi hulladékokban visszamaradó illékony és nem illékony komponensek különböző koncentrációira adott válaszreakciónak az ismerete is. Ezért további célul tűztem ki a komposztálási kísérletekbe bevont gyógynövény hulladékokban fellelhető főbb hatóanyagok antimikrobiális aktivitásának a vizsgálatát az adott *Cellulomonas* törzsekkel szemben.

FELHASZNÁLT IRODALOM

- Ahmad, Rizwan – Jilani, Ghulam – Arshad, Muhammad – Zahir, Zahir A. – Khalid, Azeem: Bio-conversion of organic wastes for their recycling in agriculture: an overview of perspectives and prospects, in *Annals of Microbiology*, 2007, no. 57., pp. 471–479.
- De Gannes, Vidya – Eudoxie, Gaius – Hickey, William J.: Prokaryotic successions and diversity in composts as revealed by 454-pyrosequencing, in *Bioresource Technology*, 2013, no. 133., pp. 573–580.
- Gabhane, Jadish – William, Spm. Prince – Bidyadhar, Rajnikant – Bhilawe, Priya – Anand, Duraisamy – Vaidya, Atul N. – Wate, Satish R.: Additives aided composting of green waste: Effects on organic matter degradation, compost maturity, and quality of the finished compost, in *Bioresource Technology*, 2012, no. 114., pp. 382–388.
- Gabrielson, Jenny – Hart, Mark – Jarelöv, Anna – Kühn, Inger – Mckenzie, Douglas – Möllby, Roland: Evaluation of redox indicators and the use of digital scanners and spectrophotometer for quantification of microbial growth in microplates, in *Journal of Microbiological Methods*, 2002, no. 50., pp. 63– 73.

▪ Greff Babett – Varga Ágnes – Hanczné Lakatos Erika: Gyógynövények hatóanyagainak kinyerése után visszamaradt extrakciós maradványok komposztálhatóságának vizsgálata, in Szalka Éva (szerk.): *XXXVII. Óvári Tudományos Napok, 2018. november 9–10. Fenntartható agrárium és környezet, az Óvári Akadémia 200 éve – múlt, jelen, jövő*, 2018, Mosonmagyaróvár, 214–223. o.
▪ Islam, Farjana – Roy, Narayan: Screening, purification and characterization of cellulase from cellulase producing bacteria in molasses, in *BMC Research Notes*, 2018, no. 11., https://doi.org/10.1186/s13104-018-3558-4.
▪ Jarvis, Nathan A. – O'bryan, Corliss A. – Ricke, Steven C. – Johnson, Michael G. – Crandall, Philip G.: A review of minimal and defined media for growth of Listeria monocytogenes, in *Food Control*, 2016, no. 66., pp. 256–269.
▪ Jurado, Macarena Del Mar – Suárez-Estrella, F. – Vargas-García, M. C. – López, Maria J. – López-González, Juan Antonio – Moreno, Joaquin: Increasing native microbiota in lignocellulosic waste composting: Effects on process efficiency and final product maturity, in *Process Biochemistry*, 2014, no. 49., pp. 1958–1969.
▪ Krishna, M. P. – Mohan, Mahesh: Litter decomposition in forest ecosystems: a review, in *Energy, Ecology and Environment*, 2017, no. 4., pp. 236–249.
▪ Qian, Xun – Sun, Wei – Gu, Jie – Wang, Xiao-Juan – Zhang, Ya-Zun – Duan, Man-Li – Li, Hai-Chao – Zhang, Ran-Ran: Reducing antibiotic resistance genes, integrons, and pathogens in dairy manure by continuous thermophilic composting, in *Bioresource Technology*, 2016, no. 220., pp. 425–432.
▪ Rajoka, M. Ibrahim – Malik, Kauser A.: Cellulase pruduction by Cellulomonas biazotea cultured in media containing different cellulosic substrates, in *Bioresource Technology*, 1997, no. 59., 21–27.
▪ Singh, Deepika – Suthar, Surindra: Vermicomposting of herbal pharmaceutical industry waste: Earthworm growth,plant-available nutrient and microbial quality of end materials, in *Bioresource Technology*, 2012, no. 112., pp. 179–185.
▪ Wei, Huawei – Wang, Liuhong – Hassan, Muhammad – Xie, Bing: Succession of the functional microbial communities and the metabolic functions in maize straw composting process, in *Bioresource Technology*, 2018, no. 256., pp. 333–341.