



UDK: 661.163.6

Originalan naučni rad
Original scientific paper

IZOLACIJA I KARAKTERIZACIJA SPOROGENIH TERMOFILNIH BAKTERIJA IZ STAJNJAKA, KAO OSNOV ZA PROIZVODNJU KOMPOSTA

Vera Raičević, Dušan Radivojević, Blažo Lalević, Igor Kljujev,
Goran Topisirović, Rade Radojević, Zoran Mileusnić

Poljoprivredni fakultet - Beograd

Sadržaj: U ovom radu predstavljeni su rezultati izolacije i identifikacije termofilnih bakterija iz stajnjaka. Ukupan broj sporogenih bakterija u stajnjaku iznosio je $2.1 \times 10^7 \text{ g}^{-1}$. Identifikacijom izolata je ustanovljeno prisustvo bakterija *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumulus* i *Bacillus amyloliquefaciens*. Ovi bakterijski sojevi, zahvaljujući svojoj enzimskoj aktivnosti, mogu uticati na ubrzanje procesa razgradnje organske materije u stajnjaku i tako doprineti proizvodnji kvalitetnog komposta.

Ključne reči: *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumulus* i *Bacillus amyloliquefaciens*,
stajnjak, kompost.

1. UVOD

Svež stajnjak predstavlja mešavinu tečnih i čvrstih životinjskih izlučevina, prostirke i velikog broja mikroorganizama.

Prostirka je obično bogata ugljenim hidratima, pre svega celulozom, a siromašna azotom. Tečne izlučevine u sebi sadrže veće količine azotnih jedinjenja i manje ugljenih hidrata a čvrste izlučevine sadrže u većem procentu proteine. Zbog velikog prisustva hranljivih materija, vlage, kiseonika stajnjak predstavlja dobru sredinu za rast i razviće različitih grupa mikroorganizama i otuda stajnjak predstavlja jednu od najbiogenijih sredina. U toku procesa zgoravanja stajnjaka dolazi do smene mezofilnih sa termofilnim mikrobnim populacijama i u tim periodima temperatura raste do 75°C .

Primenom stajnjaka u poljoprivrednoj proizvodnji utiče se na poboljšanje strukture zemljišta (Pulleman *et al.*, 2003), povećanje biodiverziteta (Oehl *et al.*, 2004) smanjuje uticaj stresa iz spoljašnje sredine (Macilwain, 2004), što sve doprinosi poboljšanju kvaliteta hrane (Giles, 2004).

Međutim, nepravilna nega stajnjaka dovodi do zagađenja podzemnih voda, eutrofikacije što se negativno odražava na kvalitet životne sredine. Treba imati u vidu da nepravilno pripremljen stajnjak predstavlja izvor patogenih bakterija koje iz takvog stajnjaka mogu dospeti i kontaminirati zemljište, vodu, životinje i čoveka (*Islam et al., 2004*). Brojni su literaturni podaci o prisustvu patogenih bakterija na plodovima povrća i voća poreklom iz nepravilno pripremljenog stajnjaka i komposta (*Lemunier et al; 2005, Franz et al; 2005, Ingham et al; 2005*). Zbog toga u organskoj proizvodnji veliki problem predstavljaju bakterije *E. coli*, *E coli 157: H7*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, *salmonella typhimurium* (*Franz et al., 2005*).

Jedan od mogućih načina rešavanja problema, koje u uslovima velikih farmi donosi stajnjak je kompostiranje čvrstog govedeg stajnjaka i dobijanje vrednog organskog đubriva. Potrebe za ovakvim organskim đubrivom su velike u konvencionalnoj a posebno u organskoj poljoprivredi.

Cilj ovog rada je bio izolacija i identifikacija termofilnih sporogenih bakterija u cilju njihove primene u procesu kompostiranja i dobijanje kvalitetnog komposta.

2. MATERIJAL I METOD

Uzorcima stajnjaka za mikrobiološke analize uzeti su iz stajnjaka sa farme Poljoprivredne Korporacije Beograd (PKB).

Ukupan broj sporogenih bakterija određen je na TS (10 x razblaženom) agaru, sa inokulumom koji je pasterizovan 10 min. na 80°C. Inkubacija je trajala 48^h na 30⁰. Brojnost bakterijske populacije određena je na 1 g suvog stajnjaka.

Dobijanje čistih kultura je obavljeno klasičnim mikrobiološkim postupcima.

Morfološke karakteristike ćelija su određene mikroskopski (Laica 300).

Identifikacija je obavljena primenom API 50CH (Biomerieux, France) a očitavanje je izvršeno API WEB (Biomerieux, France).

3. REZULTATI I DISKUSIJA

Ukupan broj sporogenih bakterija je iznosio 2.1×10^7 g⁻¹ stajnjaka.

Svi izolati su gram pozitivni štapići, koji formiraju endospore. Utvrđene su razlike u veličini ćelija kod ovih izolata (tabele 1-4). Na osnovu ovih karakteristika svi izolati pripadaju rodu *Bacillus*. Brojna istraživanja ukazuju na prisustvo različitih bakterijskih populacija u stajnjaku, ali dominantne su vrste roda *Thermus* i termofilni *Bacillus* (*Miyatake F., Iwabuchi K, 2005*).

Biohemijskim analizama (API 50 CH) je konstatovano da izolovane bakterije pripadaju vrstama *Bacillus licheniformis* (1T i 10/1T), *Bacillus pumulus* (6 T) i *Bacillus amyloliquefaciens* (10T).

Iz uzorka stajnjaka su izolovana dva soja *B. licheniformis* (1T i 10/1T) koji se međusobno razlikuju po morfološkim i nekom biohemijskim karakteristikama (tabele 1 i 2). *B. licheniformis* je gram pozitivna, ne patogena bakterija koja je široko rasprostranjena u zemljištu.

Tabela 1. Morfološke i fiziološke karakteristike *B. licheniformis* soj 1T

oblik ćelija štapić	Dulcitol –	Amidon (skrob) +
veličina ćelija 2.16 x 0.63 µm	Inozitol –	Glikogen +
spore +	D-Manitol +	Ksilitol –
proširenost sporangije –	D-Sorbitol +	Genciobioza +
Gram reakcija +	Metil-αD-Manopiranozid –	D-Turanoza +
Glicerol +	Metil-αD-Glukopiranozid +	D-Liksoza –
Eritritol –	N-Acetilglukozamin –	D-Tagatoza +
D-Arabinoza –	Amigdalinal +	D-Fukoza –
L-Arabinoza +	Arbutin +	L-Fukoza –
D-Riboza +	Eskulin +	D-Arabitol –
D-Ksiloz +	Salicin +	L-Arabitol –
L-Ksiloz –	D-Celiobioza +	kalijum glukonat –
D-Adonitol –	D-Maltoza +	kalijum 2-ketoglukonat –
Metil-βD-Ksilopiranozid –	D-Laktoza +	kalijum 5-ketoglukonat –
D-Galaktoza +	D-Melibioza –	rast na 30° C +
D-Gluukoza –	D-Saharoza +	rast na 37° C +
D-Fruktoza –	D-Trehaloza +	rast na 50° C +
D-Manoza –	Inulin +	rast na 55° C +
L-Sorboza –	D-Melezitoza –	rast na 60° C +
L-Ramnoza –	D-Rafinoza +	rast na 65° C +

Tabela 2. Morfološke i fiziološke karakteristike *B. licheniformis* soj 10/1

oblik ćelija štapić	Dulcitol –	Amidon (skrob) +
veličina ćelija 3.59 x 1.38 µm	Inozitol –	Glikogen +
spore +	D-Manitol +	Ksilitol –
proširenost sporangije –	D-Sorbitol –	Genciobioza +
Gram reakcija +	Metil-αD-Manopiranozid –	D-Turanoza –
Glicerol +	Metil-αD-Glukopiranozid –	D-Liksoza –
Eritritol –	N-Acetilglukozamin +	D-Tagatoza +
D-Arabinoza –	Amigdalinal +	D-Fukoza –
L-Arabinoza +	Arbutin +	L-Fukoza –
D-Riboza +	Eskulin +	D-Arabitol –
D-Ksiloz –	Salicin +	L-Arabitol –
L-Ksiloz –	D-Celiobioza +	kalijum glukonat –
D-Adonitol –	D-Maltoza +	kalijum 2-ketoglukonat –
Metil-βD-Ksilopiranozid –	D-Laktoza –	kalijum 5-ketoglukonat –
D-Galaktoza +	D-Melibioza –	rast na 30° C +
D-Gluukoza +	D-Saharoza +	rast na 37° C +
D-Fruktoza +	D-Trehaloza +	rast na 50° C +
D-Manoza +	Inulin –	rast na 55° C +
L-Sorboza –	D-Melezitoza –	rast na 60° C +
L-Ramnoza –	D-Rafinoza –	rast na 65° C +

Ova bakterija zahvaljujući sposobnosti sinteze ekstracelularnog enzima alfa amilaze, (degradira α 1-4 glikozidne veze) sposobna je da razgrađuje skrobne supstance kao što su rastvorljivi skrob iz pšenice, kukuruza, pirinča, ječma i dr. (*Ikram-ul-Haq et al; 2005*). *B. licheniformis* je često prisutan u kompostu i ima sposobnost sinteze antifungalnih supstanci koje inhibiraju rast fitopatogenih gljiva (*Phae et al; 1990*). Pored toga može da produkuje antibiotik bacitracin koji inhibira rast patogenih enterobakterija: *Salmonella sp.*, *Shigella flexineri*, *Staphylococcus aureus* (*Ichida et al; 2001*), što je značajno u procesu proizvodnje komposta.

Iz uzorka stajnjaka izolovan je *B. pumilus* (soj 6T). To je gram pozitivna, štapičasta bakterija, veličine ćelija 2.07 x 0.71 μm . (tab. 3).

Tabela 3. Morfološke i fiziološke karakteristike *B. pumilus* soj 6T

oblik ćelija štapić	Metil- α D-Manopiranozid +	Amidon (skrob) –
veličina ćelija 2.07 x 0.71 μm	Dulcitol –	Glikogen –
spore +	Inozitol –	Ksilitol –
proširenost sporangije –	D-Manitol +	Genciobioza +
Gram reakcija +	D-Sorbitol –	D-Turanoza –
Glicerol +	Metil- α D-Glukopiranozid –	D-Liksoza –
Eritritol –	N-Acetilglukozamin +	D-Tagatoza +
D-Arabinosa –	Amigdalinalin +	D-Fukoza –
L-Arabinosa +	Arbutin +	L-Fukoza –
D-Riboza +	Eskulin +	D-Arabitol –
D-Ksiloza +	Salicin +	L-Arabitol –
L-Ksiloza –	D-Celiobioza +	kalijum glukonat –
D-Adonitol –	D-Maltoza –	kalijum 2-ketoglukonat –
Metil- β D-Ksilopiranozid –	D-Laktoza +	kalijum 5-ketoglukonat –
D-Galaktoza +	D-Melibioza +	rast na 30° C +
D-Gluukoza +	D-Saharoza +	rast na 37° C +
D-Fruktoza +	D-Trehaloza +	rast na 50° C +
D-Manoza +	Inulin –	rast na 55° C +
L-Sorboza –	D-Melezitoza –	rast na 60° C +
L-Ramnoza –	D-Rafinoza +	rast na 65° C +

Za *B. pumilus* je karakteristično da u uslovima visoke temperature i visokog alkaliteta proizvodi enzim alkalnu ksilanazu (Duarte et al; 1999). Ksilanaza je enzim koji degradira ksilan, (komponenta hemiceluloze) prisutan u različitom biljnom materijalu, kao i otpadu iz tekstilne i prehrambene industrije. Takođe je poznato da ova bakterija proizvodi ekstracelularne enzime koji razgrađuju pektinske materije (Klug-Santner et al; 2005), i predstavljaju potencijal za industrijsku proizvodnju termostabilne pektinaze (Sharma et al; 2005).

Tabela 4. Morfološke i fiziološke karakteristike *B. amyloliquefaciens* soj 10T

oblik ćelija štapić	Dulcitol –	Amidon (skrob) +
veličina ćelija 3.46 x 1.03 μm	Inozitol –	Glikogen +
spore +	D-Manitol +	Ksilitol –
proširenost sporangije –	D-Sorbitol –	Gentiobioza +
Gram reakcija +	Metil- α D-Manopiranozid –	D-Turanoza –
Glicerol +	Metil- α D-Glukopiranozid –	D-Liksoza –
Eritritol –	N-Acetilglukozamin +	D-Tagatoza +
D-Arabinosa –	Amigdalinalin +	D-Fukoza –
L-Arabinosa +	Arbutin +	L-Fukoza –
D-Riboza +	Eskulin +	D-Arabitol –
D-Ksiloza –	Salicin +	L-Arabitol –
L-Ksiloza –	D-Celiobioza +	kalijum glukonat –
D-Adonitol –	D-Maltoza +	kalijum 2-ketoglukonat –
Metil- β D-Ksilopiranozid –	D-Laktoza –	kalijum 5-ketoglukonat –
D-Galaktoza –	D-Melibioza –	rast na 30° C +
D-Gluukoza +	D-Saharoza +	rast na 37° C +
D-Fruktoza +	D-Trehaloza +	rast na 50° C +
D-Manoza +	Inulin –	rast na 55° C +
L-Sorboza –	D-Melezitoza –	rast na 60° C +
L-Ramnoza –	D-Rafinoza –	rast na 65° C +

B. amyloliquefaciens je takođe gram-pozitivna sporogena bakterija, široko rasprostranjena u zemljištu. Ova bakterija u morfološkom i biohemijskom pogledu pokazuje veliku sličnost sa *B. subtilis*. Soj 10T koji je izolovan iz stajnjaka odlikuje se dobrim rastom na temperaturama od 30 °C do 65 °C (tab. 4).

Primena bakterija kao biokontrolnih agenasa se u poslednje vreme intenzivno izučava (Souto et al; 2004, Yu et al; 2002). Značajno mesto zauzimaju vrste iz roda *Bacillus* za koje je dokazano da stvaraju različite antifungalne materije peptidne i lipopeptidne prirode, kao što su fungicin, iturin, bacilomicin i dr. Ove materije mogu inhibirati rast fitopatogenih gljiva iz rodova *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*. *B. amyloliquefaciens* proizvodi antifungalne komponente koje inhibiraju rast *Fusarium*, *Rhizoctonia solani* i *Sclerotinia*. Dokazano je da *B. amyloliquefaciens* stvarajući različite izomere iturina A, inhibira rast *R. solani* u *in vitro* uslovima. (Yu et al., 2002). Pored uloge koju ima u kontroli rasta fitopatogenih gljiva, *B. amyloliquefaciens* proizvodi i enzime, kao što su α -amilaza, subtilisin i barnaze (a ribonukleaze).

Zahvaljujući sposobnosti sinteze različitih enzima, kao i sposobnosti sinteze različitih antifungalnih i antibakterijskih jedinjenja opravdano je unošenje bakterijskih populacija u stajnjak (Arkhipchenko et al., 2005), u cilju dobijanja kvalitetnog komposta. Ove karakteristike bakterija iz roda *Bacillus* opravdavaju njihovu primenu u proizvodnji zdravstveno bezbedne hrane.

Treba imati u vidu da su ovo aerobni procesi i da je neophodno obezbediti aerobne uslove za normalan rast ovih bakterija.

4. ZAKLJUČAK

Broj sporogenih bakterija u stajnjaku je iznosio $2.1 \times 10^7 \text{ g}^{-1}$.

U ispitivanom uzorku je konstatovano prisustvo sporogenih aerobnih bakterija *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumulus* i *Bacillus amyloliquefaciens*.

Svi izolovani sojevi se odlikuju dobrim rastom na temperaturi od 30 do 65 °C.

Biohemijske karakteristike ovih sojeva opravdavaju njihovu primenu u procesu kompostiranja stajnjaka.

LITERATURA

- [1] Phae C.G., M. Sasaki, M. Shoda and H. Kubota (1990): Characteristic of *Bacillus subtilis* isolated from composts suppressing phytopathogenic microorganism. *Soil Sci. Plant Nutr.* 36, pp. 568-575.
- [2] Lettuce Franz E, van Diepeningen AD, de Vos OJ, van Bruggen AH. (2005): Effects of Cattle Feeding Regimen and Soil Management Type on the Fate of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium in Manure, Manure-Amended Soil, and Lettuce. *Appl Environ Microbiol.*; 71(10):6165-74.
- [3] Pulleman M., Jongmans A., Marinissen J., Bouma J. (2003): Effects of organic versus conventional arable farming on soil structure and organic matter dynamics in a marine loam in the Netherlands. *Soil Use and Management* 19, 157-165.
- [4] Oehl F., Sieverding E., Maeder P., Dubois D., Ineichen K., Boller T., Wiemken A. (2004): Impact of long-term conventional and organic farming on the diversity of arbuscular mycorrhizal fungi. *Oecologia* 138, 574-583.
- [5] Macilwain C. (2004): Is organic farming better for the environment? *Nature (London)* 428, 797-798.
- [6] Giles J. (2004): Is organic food better for us. *Nature (London)* 428, 796-797.

- [7] Lemunier M, Francou C, Rousseaux S, Houot S, Dantigny P, Piveteau P, Guzzo J. (2005): Long-term survival of pathogenic and sanitation indicator bacteria in experimental biowaste composts. *Appl Environ Microbiol.*; 71(10):5779-86.
- [8] Ingham SC, Fanslau MA, Engel RA, Breuer JR, Breuer JE, Wright TH, Reith-Rozelle JK, Zhu J. (2005): Evaluation of fertilization-to-planting and fertilization-to-harvest intervals for safe use of noncomposted bovine manure in Wisconsin vegetable production. *Food Prot.*; 68(6):1134-42.
- [9] Souto G.I., Correa O.S., Montecchia M.S., Kerber N.L., Poucheu N.L., Bachur M., Garcia A.F. (2004): Genetic and functional characterization of a *Bacillus sp.* strain excreting surfactin and antifungal metabolites partially identified as iturin-like compounds. *Journal of Applied Microbiology*, 97, 1247-1256.
- [10] Fumihito Miyatake and Kazunori Iwabuchi (2005): Effect of high compost temperature on enzymatic activity and species diversity of culturable bacteria in cattle manure compost. *Bioresource Technology* 96, 1821-1825.
- [11] Arkhipchenko I.A., Salkinoja-Salonen M.S., Karyakina J.N., Tsitko I. (2005): Study of three fertilizers produced from farm waste. *Applied Soil Ecology* 30, 126-132.
- [12] Yu G.Y., Sinclair J.B., Hartman G.L., Bertagnolli B.L. (2002): Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. *Soil Biology & Biochemistry* 34, 955-963.
- [13] Duarte M.C.T., Portugal E.P., Ponezi A.N., Bim M.A., Tagliari C.V., Franco T.T. (1999): Production and purification of alkaline xylanases. *Bioresource Technology* 68, 49-53.
- [14] Ikram-ul-Haq, Hamad Ashraf, Qadeer M.A., Javed Iqbal (2005): Pearl millet, a source of alpha amylase production by *Bacillus licheniformis*. *Bioresource Technology* 96, 1201-1204.
- [15] Sharma D.C., Satyanarayana T. (2005): A marked enhancement in the production of a highly alkaline and thermostable pectinase by *Bacillus pumilus* dscr1 in submerged fermentation by using statistical methods. *Bioresource Technology* (accepted 4 April 2005).
- [16] Klug-Santner B.G., Schnitzhofer W., Vršanska M., Weber J., Agrawal P.B., Nierstrasz V.A., Guebitz M.G. (2005): Purification and characterization of a new bioscouring pectate lyase from *Bacillus pumilus* BK2. *Journal of Biotechnology* (accepted 14 July 2005).
- [17] Ichida M.J., Krizova L., LeFevre C.A., Keener M.H., Elwell D.L., Burt E.H. (2001): Bacterial inoculum enhances keratin degradation and biofilm formation in poultry compost. *Journal of Microbiological Methods* 47, 199-208.

Napomena: Rad je nastao kao rezultat istraživanja u toku realizacije Inovacionog projekta MNT PTR 20 89 B.

IZOLATION AND CHARACTERIZATION SPOROGENIC THERMOPHILIC BACTERIA FROM MANURE AS REASON FOR COMPOST PRODUCTION

Vera Raičević, Dusan Radivojević, Blažo Lalević, Igor Kljujev,
Goran Topisirović, Rade Radojević, Zoran Mileusnić

Faculty of Agriculture - Belgrade

Abstract: This paper shows results of isolation and identification thermophilic bacteria from manure. Total number of sporogenic bacteria in manure was $2.1 \times 10^7 \text{ g}^{-1}$. It is investigated presence of *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus* i *Bacillus amyloliquefaciens*. These strains of bacteria, on basic enzymatic activity, can speed up degradation organic matter in manure and have a share in production high-quality compost.

Key words: *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus* and *Bacillus amyloliquefaciens*, manure, compost.