

PRZYDATNOŚĆ ODPADOWEGO PODŁOŻA LIGNO-CELULOZOWEGO W HODOWLI GRZYBNI BOCZNIAKA *PLEUROTUS OSTREATUS*

Kalina Jagodzińska (Gdynia)

Streszczenie

Biotechnologia to jedna z najbardziej dynamicznie rozwijających się dyscyplin naukowych. Ważną rolę odgrywają w niej procesy uwarunkowane działalnością mikroorganizmów, w tym te wykorzystujące grzybnie bocznika *Pleurotus ostreatus*. Jest to grzyb o wysokich walorach smakowych i cennych właściwościach odżywczych. Jego hodowla składa się z trzech etapów: pasteryzacji podłoża, inkubacji (rozrastania się grzybni) oraz wyrastania owocników. Niniejsza praca dotyczy drugiego z wymienionych stadiów. Jej celem było skomponowanie podłoża pod wzrost grzybni bocznika *Pleurotus ostreatus* i sprawdzenie, na którym z nich uzyska się najszyb-



szy przyrost grzybni. Przy wyborze materiałów na podłoże hodowlane ważna jest ich cena oraz dostępność przez cały rok. Mając to na uwadze podjęto próbę zagospodarowania stałych odpadów ligno-celulozowych, których składowanie stanowi poważne zagrożenie dla środowiska naturalnego. Do badań użyto również młóta gorzelnianego oraz serwatki, które nie są w pełni wykorzystywane przez przemysł. Znajdują one zastosowanie głównie jako pasze dla zwierząt. Warto zaznaczyć, że zużyte podłoże pochodzące można by również po wysuszeniu przeznaczyć na pasze lub nawóz. Podstawę stosowanych podłoży stanowiły krążki wycięte z arkuszy odpadu ligno-celulozowego. Nasączono je odpowiednio: wodą destylowaną, roztworem pobranym z serwatki po opadnięciu zdenaturowanych białek, wywarem z młóta lub też nanoszono młóto na powierzchnię nasączonego wodą krążka. Zgodnie z postawioną

hipotezą grzybnia rosła najszybciej na podłożu z naniesionym na powierzchnię krążka młótem. Natomiast na podłożu z roztworem pochodzącym z serwatki grzybnia przyrastała najwolniej, więc nie jest to dla niej dobra pożywka.

Wstęp

Rozwój przemysłu drzewnego, celulozowo-papierniczego i rolno-spożywczego wiąże się z wytwarzaniem dużych ilości odpadów ligno-celulozowych. Gromadzone na hałdach stanowią one poważne zagrożenie dla środowiska naturalnego. Obecnie coraz większe zainteresowanie wzbudza utylizacja odpadów drzewnych za pomocą wyselekcjonowanych mikroorganizmów, prowadząca do otrzymywania głównie białka paszowego. Niniejsza praca ma na celu zbadanie kinetyki wzrostu grzybni na tego typu odpadzie. Celem pracy było również uzyskanie odpowiedzi na pytanie: czy dodanie roztworu uzyskanego z serwatki lub młóta gorzelnianego wpłynie korzystnie na szybkość wzrostu grzybni? Postawiłam **dwie hipotezy**. Po pierwsze prawdopodobnie grzybnia najszybciej opanuje podłoże z młótem naniesionym na powierzchnię krążka (ze względu na jego rozdrobioną formę i skład). Po drugie przyjąłam, że dodanie roztworu pochodzącego z serwatki również wpłynie korzystnie na rozwój grzybni (więcej dostępnych substancji odżywczych).

Podstawowe założenia pracy badawczej:

- Rozmnażanie grzybni *Pleurotus ostreatus*.
- Przygotowanie podłoży i ich sterylizacja.
- Posiew powierzchniowy grzybni na przygotowanych podłożach.
- Inkubacja grzybni.
- Odczytywanie (co 24 h) za pomocą linijki promieni kolonii rosnących grzybni.
- Wyznaczenie promieniowej szybkości wzrostu.

Material i metody

Użyty sprzęt i stosowane odczynniki

Autoklaw pionowy TYP-A6, komora laminarna KLHS-1 Polon, ciepłarka CWE-2, waga laboratoryjna

TYP WA-31, lodówka, eza, pipety, probówki, gruszka, nożyczki, 24 płytki Petriego o średnicy 10 cm, palnik, zlewka, linijka, marker, 70% etanol, woda destylowana.

Stosowany organizm

Grzybnię bocznika otrzymano z banku grzybni Zakładu Inżynierii Chemicznej i Bioprosesowej w Bydgoszczy. Najpierw sporządzono podłoże hodowlane potrzebne do jej rozmnażania, o składzie: glukoza–40,000 g, KCl–0,200 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ –0,200 g, KH_2PO_4 –0,140 g, $CaCl_2$ –0,200 g, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ –1,900 g, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ – 0,017 g, tiamina – 0,020 g, L-asparagina – 4,000 g, L-metionina – 0,072 g, L-prolina – 0,208 g, DL-tryptofan – 0,064 g, roztwór mikroelementów (H_3BO_3 – 0,055 g, $CuSO_4$ – 0,250 g, $MnSO_4$ – 0,055 g, $(NH_4)_6Mo_7O_{34} \cdot 4H_2O$ – 0,037 g, $ZnSO_4$ – 4,900 g, woda destylowana do objętości $1 dm^3$) – $1 cm^3$, agar – 20,000 g, woda destylowana do objętości $1 dm^3$. Podłoże to zestalono w postaci skosów w szklanych probówkach. Skosy otrzymano w wyniku rozlania gorącego podłoża w postaci małych ($5 cm^3$) porcji do wysterylizowanych wcześniej probówek. Po rozlaniu podłoża probówki układano pod kątem ok. 5° . Podłoże rozlewano w komorze laminarnej, której sterylność uzyskano przez wcześniejsze naświetlenie promieniami nadfioletowymi. Rozmnażanie grzybni przechowywanej dotąd w lodówce poprzedzało przeniesienie jej na 24 h do cieplarki ($25^\circ C$). W kolejnym etapie pobierano ezę niewielką ilość strzępek z probówki otrzymanej z banku grzybni i umieszczano je na powierzchni nowych sześciu skosów. Proces ten odbywał się w komorze do szczepień w bliskim otoczeniu płomienia palnika gazowego. Probówki z przeszczepioną grzybnią (zamknięte korkami z waty) przeniesiono następnie do cieplarki. Cała powierzchnia skosów pokryła się grzybnią po ośmiu dniach. Otrzymana grzybnia stanowiła materiał biologiczny stosowany do otrzymania inoculum użytego w badaniach.

Charakterystyka materiałów użytych do skomponowania podłoża

Stosowane odpady ligno-celulozowe w formie arkuszy $50 \times 50 cm$ stanowiły bieżący odpad produkcyjny pochodzący z fabryki Mondi Packaging Paper Świecie S.A. Nie zaobserwowano skażenia mikrobiologicznego ich powierzchni. Serwatkę otrzymano ze Spółdzielni Mleczarskiej „Polmlek-Maćkowy”. Sucha masa stanowiła jej 5,5%: popiół surowy 0,6%, białko ogólne 0,7%, związki bezazotowe wyciągowe

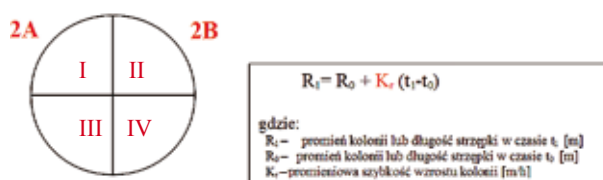
(węglowodany) 4,2%. Młóto gorzelniane pochodziło z zakładu produkcji spirytusu Komers International w Goszynie. W skład młóta wchodziły części białek, tłuszczy i włókna zawarte głównie w łuskach. W porównaniu z materiałem wyjściowym, jakim jest ziarno pszenicy, do młóta przechodzi około 75% związków azotowych, 80% tłuszczu, 20% związków bezazotowych wyciągowych i całe włókno surowe (1). Zawartość wody w świeżym młócie wynosiła 60%. Serwatka, jak i świeże młóto to produkty nietrwałe, ponieważ zawierają dużo wody i składników fermentujących. Od razu po otrzymaniu wysterylizowano je przez 30 min pod ciśnieniem 7/10 atmosfery w autoklawie. Wykorzystano również 24-godzinny ekstrakt



Ryc. 1. Schemat nasączenia krążków.

z młóta gorzelnianego (1,6 g młóta na $24 cm^3$ wody destylowanej).

Przygotowano 24 wysterylizowane płytki Petriego. Ilości składników dobrano tak, aby uzyskać wilgotność podłoża ok. 80%. Na każdej płytce umieszczono wysuszony krążek o średnicy 9,5 cm i wadze 6 g, wycięty z odpadu ligno-celulozowego. Krążki nasączono po sześć wg schematu (ryc. 1). Połowę ilości odpowiedniej cieczy nanoszono za pomocą pipety bezpośrednio na szalkę Petriego. Następnie umieszczano krążek na szalce i nanoszono drugą połowę cieczy na powierzchnię krążka. Po nasiąknięciu krążek zajmował całe dno szalki. Białka serwatki pod wpływem temperatury w autoklawie uległy denaturacji i opadły na dno naczynia (pobierano roztwór z nad osadu). Podłoże nr 3 przygotowano tak, aby młóto było wilgotne (drugą część wody naniesiono po rozprowadzeniu młóta na powierzchni krążka). Gotowe podłoża sterylizowano przez 45 min. w autoklawie pod ciśnieniem jednej atmosfery. Próbkę kontrolną stanowiło podłoże z krążkiem nasączonym wodą destylowaną. Tak przygotowane podłoża zaszczerpiono grzybnią, pobierając niewielką ilość jej strzępek ze

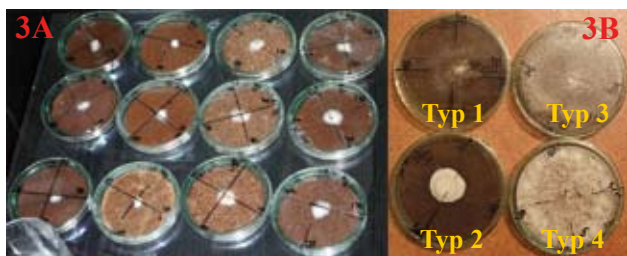


Ryc. 2. A – Podziałka służąca do mierzenia promienia kolonii rosnącej grzybni. B – Wzory opisujące kinetykę wzrostu grzybni.

skosu agarowego i umieszczając w centrum podłoża. Posiew powierzchniowy wykonano w komorze laminarnej, opalając wyloty probówek i pipet w płomieniu palnika, a także wyzarzając używane podczas posiewu ezy (6). Na górnej części każdej płytki Petriego narysowano wcześniej dwie prostopadłe linie, przecinające się w centrum płytki (ryc. 2 A). Wieczko i denko każdej płytki po zaszczepieniu grzybni przymocowano w dwóch miejscach taśmą samoprzylepną. Taśma uniemożliwiła przesuwanie się górnej części płytki względem dolnej. Temperatura optymalna dla wzrostu grzybni bocznika wynosi 26–27°C. Temperatura powyżej 30°C hamuje wzrost grzybni, a w temperaturze niższej od 26°C wzrost jest dużo wolniejszy, aż w 5°C ustaje (2, 8). Tak przygotowane płytki umieszczono w cieplarni w temperaturze 27°C. W tych warunkach grzybnia utworzyła promieniowo rozrastające się kolonie. Za pomocą linijki co 24 godziny odczytywano długości promieni I, II, III i IV (ryc. 2 A). Następnie sumowano długości promieni I i III oraz II i IV i wyliczano średnią tych dwóch wielkości. Odejmując od niej średnią wyliczoną 24 godziny wcześniej otrzymano przyrost promienia grzybni (dr) po czasie (t). Wyniki dla każdej z trzech prób przeprowadzonych dla poszczególnych podłoży były bardzo zbliżone. Po wyznaczeniu średniej tych wartości dr_{sr} (z sześciu płytek) w czasie t wyliczono wartość promieniowej szybkości wzrostu Kr .

Wyniki

Badania przeprowadzono w Katedrze Fizjologii Roślin Uniwersytetu Gdańskiego, na wydziale technologii i inżynierii chemicznej Uniwersytetu Technologiczno-Przyrodniczego w Bydgoszczy oraz moim domu, w dniach 04.09.2009 – 29.09.2009.

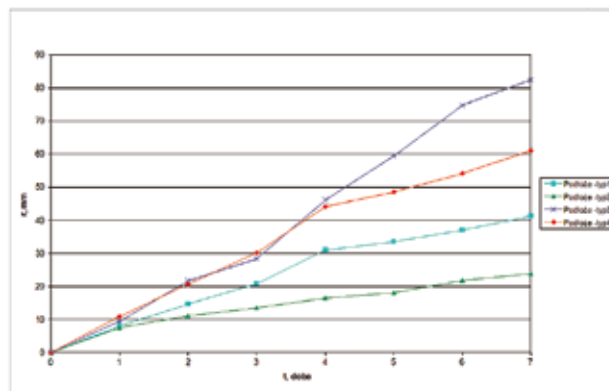


Ryc. 3. Przyrost grzybni po pierwszym (A) i szóstym (B) dniu badań.

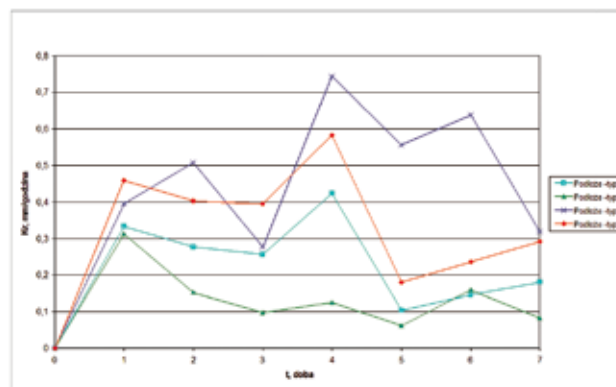
Dyskusja

Po dokonaniu serii badań okazało się, że na krążku z odpadu ligno-celulozowego nasączonym wodą destylowaną grzybnia rozrasta się dość dobrze (promień kolonii grzybni równy ponad 4 cm po szóstym dniu). W odpadach ligno-celulozowych celuloza stanowi

najcenniejszy składnik, ponieważ produktem jej hydroлізу jest glukoza. Ten cukier prosty jest łatwo przyswajany przez mikroorganizmy, w tym bocznika. Dzięki obecności odpowiednich enzymów hydroliza celulozy przebiega stosunkowo szybko. Wydajnie przebiega też skracanie trójwęglowych łańcuchów bocznych, demetylacja i rozrywanie aromatycznych pierścieni w jednostkach strukturalnych ligniny (4), dlatego krążki te stanowią doskonałe podłoże dla wzrostu grzybni. Najwyższą wartość promieniowej szybko-



Ryc. 4. Promień kolonii grzybni *P. ostreatus* na podłożach typu 1÷4 w zależności od czasu.



Ryc. 5. Promieniowa szybkość wzrostu grzybni *P. ostreatus* na podłożach typu 1÷4 w zależności od czasu.

ści wzrostu grzybni uzyskano na podłożu z młótem gorzelnianym (nr 3). Hipoteza pierwsza została więc potwierdzona. Wynika to z rozdrobnienia młóta oraz jego składu. Grzybnia bardzo szybko opanowuje grubo śrutowane młóto ze względu na jego dużą łączną powierzchnię, a rozerwane łuski i pokruszone ziarna stanowią dla grzybni dobrą pożywkę. Grzybnia zaszczepiona na podłożu nr 4 osiągnęła drugą pod względem wielkości promieniową szybkość wzrostu. Myślę, że łatwo przyswoiła rozpuszczone w wodzie destylowanej substancje odżywcze. Do ekstraktu przeszła jednak tylko część z nich. Grzybnia miała do dyspozycji dużo mniej związków azotowych, węglowodanów i innych substancji w tym zwłaszcza tłuszczu,

które nie są rozpuszczalne w wodzie. Ponadto sam krążek nie stanowi aż tak korzystnego podłoża jak krążek z młótem w postaci rozdrobnionej. Ma on dużo mniejszą łączną powierzchnię oraz mniej „zakamarków”, w które mogłyby wrosnąć strzępki grzybni. Stąd też zaobserwowana niższa szybkość przyrostu grzybni niż podłożu nr 3. Na podłożu z dodatkiem roztworu uzyskanego z serwatki grzybni osiągnęła najniższą promieniową szybkość wzrostu i drugą hipotezę należy odrzucić. Kolonia grzybni wyglądała jak grzyb po wybuchu jądrowym (ryc. 3B typ 2). Skupiła się w centralnej części szalki tak, aby ograniczyć swój kontakt z podłożem do minimum. Promień kolonii grzybni wzrastał wolniej niż dla próby kontrolnej. Prawdopodobnie dodanie roztworu laktozy pochodzącego z serwatki spowodowało wytworzenie metabolitów hamujących wzrost grzybni (3, 7).

W danych literaturowych brakuje informacji dotyczących wzrostu grzybni na podłożach użytych w niniejszej pracy. Na skale przemysłową uprawia się boczniaka głównie na słomie. Stosując podłoże ze słomy żytniej uzyskano promień kolonii grzybni w kolejnych dniach równy: 1; 2; 3,5; 4; 6; 8 cm, natomiast używając podłoże z trocin bukowych promień kolonii grzybni wyniósł: 0,5 cm po pierwszym dniu, 1,2 cm po drugim, następnie: 1,8; 2,4; 3; 4 cm (w optymalnych warunkach, temperatura równa 26°C). Analizując wykres nr 1 możemy zauważyć, że na podłożu nr 3 promień kolonii grzybni w ostatnim dniu badań wyniósł ponad 8 cm. Również promienie osiągnięte w przypadku grzybni zaszczerpionej na podłożach nr 4 i nr 1 w szóstym dniu badań nie odbiegają znacząco od promieni kolonii grzybni podanych w literaturze dla podłoża ze słomy żytniej czy też trocin bukowych (8).

Promieniowa szybkość wzrostu grzybni na początku hodowli była zbliżona dla wszystkich prób. Może być to spowodowane czasem, jaki grzybni potrzebowała na wytworzenie odpowiednich enzymów rozkładających celulozę, hemicelulozy, ligninę i inne substancje (4, 5). Transformacja ligno-celulozy jest procesem biochemicznym. Enzymy dyfundują przez ścianę komórkową grzyba do otaczającego podłoża i tam spełniają swoją funkcję, polegającą na przetwarzaniu składników podłoża. Należy zaznaczyć, że enzymy biorące w tym udział mogą być indukowane składnikami podłoża, których obecność powoduje tworzenie mRNA swoistego dla syntezy indukcyjnych form enzymu. Dane literaturowe podają wiele tego typu przykładów (3). Pomimo, że taki mechanizm nie zawsze jest regułą, np. ligninaza (ligninowa peroksydaza) nie indukuje się ligniną zawartą w podłożu (4), można przypuszczać, że grzybni potrzebowała czasu na wytworzenie odpowiednich enzymów, aby przygotować się do wzrostu.

Kalina Jagodzińska - studentka I roku kierunku lekarskiego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, absolwentka III LO w Gdyni (klasa o profilu biol.-chem.-fiz.-ang). Inspiracją do napisania niniejszej pracy była chęć skomponowania nowych podłoży pod hodowlę grzybni boczniaka (wykorzystano odpady ligno-celulozowe, serwatkę i młoto gorzelniane). Praca została wyróżniona podczas XXXIX Ogólnopolskiej Olimpiady Biologicznej. Autorka uzyskała tytuł laureata i tym samym maksymalną liczbę punktów w rekrutacji na studia.

Bibliografia

1. Dulcet E., 2008 - Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering. 53(3).
2. Kalbarczyk J., 1985 - Amatorska uprawa grzybów. Instytut Wydawniczy Związków Zawodowych, Warszawa.
3. Müller E., Loeffler W., 1987 - Zarys mikologii. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa.
4. Nowakowska-Waszczyk A., 1975 - Postępy Mikrobiologii. 14, 87.
5. Schlegel H.G., 1996 - Mikrobiologia ogólna. PWN, Warszawa.
6. Sharma K., 2007 - Manual of MICROBIOLOGY: Tools and techniques. Ane Books India, New Delhi.
7. Viesturs E., 1992 - Biotechnologia. WNT.
8. Ziobra M., Gapiński M. i in., 1995 - Boczniak. PWRiL, Poznań.

Errata

W numerze 10–12 tomu 111 *Wszechświata* doszło z winy redakcji do pomyłki w tytule artykułu Mateusza Okrutniaka, którego właściwa wersja to: „Rekultywacja terenów po Krakowskich Zakładach Sodowych – sukces czy porażka?”. Przepraszamy za pomyłkę.
