

ANNA RODZIEWICZ  
JUSTYNA SOBOLCZYK  
WOJCIECH ŁABA  
ANNA CHOŃSKA

Wydział Nauk o Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy, Wrocław

FABIOLA BUBEL

Instytut Górnictwa Odkrywkowego Poltegor-Instytut, Wrocław

JAKUB BEKIER

Wydział Przyrodniczo-Technologiczny, Uniwersytet Przyrodniczy, Wrocław

# Wykorzystanie szczepionki drobnoustrojów do kompostowania odpadów keratynowych w bioreaktorze statycznym

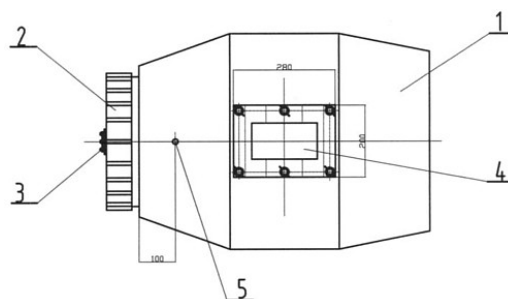
## Wstęp

Odpady keratynowe obejmują: pierze, szczecinę, włosy, rogi, kopyta i inne wyrostki skóry kręgowców, których głównym składnikiem budulcowym są białka włóknikowe keratyny. Ze względu na ich budowę strukturalną zaliczają się do związków trudno degradable. Aspekty ekologiczne wskazują na konieczność przyspieszenia ich biodegradacji, co jest możliwe poprzez sterowanie procesu zarówno w ujęciu biologicznym, jak i technologicznym [1]. Drobnoustroje keratynolityczne, do których zaliczają się bakterie z rodzaju *Bacillus*, mogą w warunkach kontrolowanych z dużą efektywnością degradować te białka do aminokwasów, które w dalszych przemianach podlegają mineralizacji [2]. Jedną z możliwych aplikacji uzyskanego produktu jest nawożenie gleby [3, 4].

Celem badań prezentowanej pracy było określenie możliwości przyspieszenia degradacji piór kurzych w procesie kompostowania w bioreaktorze statycznym, przy udziale szczepionki keratynolitycznych bakterii *Bacillus subtilis* P22, wyizolowanych w badaniach własnych.

## Materiały i metody

**Kompostowanie** prowadzono w skali półtechnicznej w systemie zamkniętego reaktora statycznego (Rys. 1) o pojemności 200 dm<sup>3</sup>, z napowietrzaniem wymuszonym, za pośrednictwem kompresora HL 275/50 (30 m<sup>3</sup> na dobę). Kompostowanym materiałem było poubojowe pierze kurze w mieszaninie z trocinami drzewnymi i pyłem węgla brunatnego, w proporcji 2:1:1. Wilgotność masy utrzymywano w zakresie 50–60%. Kompostowanie prowadzone było w dwóch reaktorach, z których jeden zaszczepiany był płynną kulturą bakterii *Bacillus subtilis* P22 w ilości 7%, w czasie zerowym oraz w 37 dobie procesu, natomiast drugi stanowił kontrolę, w której proces zachodził przy udziale autochtonicznej mikroflory, bez inokulacji szczepionką bakterii. Przebieg trwającego 71 dni kompostowania monitorowano poprzez pomiary: temperatury, odczynu środowiska i wilgotności. Analizy mikrobiologiczne, biochemiczne i chemiczne wykonywano czterokrotnie po czasach: 0, 3, 42, 71 dobach. **Badania mikrobiologiczne** obejmowały:



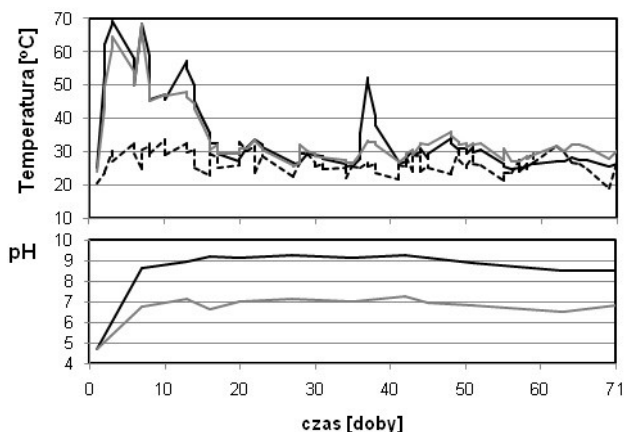
Rys. 1. Reaktor statyczny: 1 – pojemnik z tworzywa PP (wymiary: średnica 500 / 700 mm, wysokość 890 mm), 2 – hermetyczna pokrywa, 3 – tuleja doprowadzająca powietrze, 4 – filtr węglowy eliminujący odory, 5 – otwór pomiaru temperatury

ogólną liczbę bakterii na zagarowanym bulionie z glukozą, w temperaturze 30°C, liczbę bakterii termofilnych na tym samym podłożu, w temp. 55°C, liczbę drobnoustrojów proteolitycznych na agarze mlecznym w temp. 30°C, liczbę bakterii przetrwalnikujących na bulionie z glukozą po 10 minutowej preinkubacji w temp. 80°C, liczbę grzybów strzępkowych na pożywce PDA w temp. 25°C. Wyniki wyrażano jako jednostki tworzące kolonie na gram s.m. kompostu (jtk/g). **Analizy biochemiczne** dotyczyły aktywności enzymów proteolitycznych i dehydrogenaz. Aktywność proteolityczną oznaczano zmodyfikowaną metodą *Ladd i Butler* [5] wobec kazeiny i wyrażano w jednostkach aktywności, przyjmując że jedna jednostka odpowiada ilości mikromoli tyrozyny utworzonej w czasie 1 minuty, w przeliczeniu na 1 g s.m. kompostu. Aktywność dehydrogenaz wyznaczano metodą *Casida* i wsp. [6] względem chlorku 2,3,5-trifenilo tetrazoliowego (TTC). Za jednostkę aktywności przyjęto ilość mikromoli powstałego 1,3,5-trifeniloformazanu (TPF) w ciągu 20 godzin inkubacji, w przeliczeniu na 1 g s.m. kompostu. **Oznaczenia chemiczne:** azot ogólny ( $N_{og}$ ) oznaczano metodą *Kjeldahla*, azot amonowy i azotanowy ( $N-NH_4$  i  $N-NO_3$ ) w ekstraktach wodnych (1:10) badano spektrofotometrycznie, siarkę ogólną ( $S_{og}$ ) w aparacie CS-MAT, węgiel organiczny ( $C_{org}$ ) – metodą oksydymetryczną z użyciem r-ru  $K_2Cr_2O_7$  oraz frakcje węgla

rozpuszczalnego w wodzie ( $C_w$ ) [7]. **Szczepionkę bakteryjną** stanowiła 12-godzinna hodowla w bioreaktorze mieszadłowym AK10, keratynolitycznych bakterii *Bacillus subtilis* P22 o gęstości  $1 \cdot 10^{10}$  komórek/ml, uzyskana na podłożu serwatkowym wzbogaconym 3% hydrolizatu skrobiowego i 1,5% zarodków pszennych.

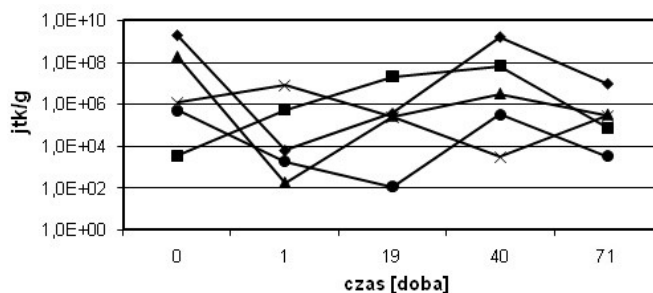
### Wyniki i dyskusja

Proces kompostowania obejmuje wielokierunkowe przemiany biochemiczne przy udziale drobnoustrojów, które kolonizując środowisko często tworzą biofilm. Aktywność metaboliczną sukcesywnie zmieniających się mikroorganizmów oraz fazy kompostowania odzwierciedla temperatura masy kompostowej. Na tej podstawie widoczna była różnica w przebiegu procesu w kompoście badawczym i kontrolnym. Termiczna faza kompostu badawczego trwała od pierwszej do trzynastej doby, przy czym przez trzy doby temperatura osiągała poziom 69°C. W kompoście kontrolnym faza termiczna była krótsza, gdyż trwała od drugiej do siódmej doby, a najwyższa temperatura 68°C pojawiła się tylko w piątej dobie (Rys. 2). Kompost badawczy już po 3 tygodniach wchodził w fazę dojrzewania (25–28°C), gdy w kontrolnym do 71 doby jeszcze utrzymywała się podwyższona temperatura w zakresie 28–32°C. Odczyn kompostu badawczego od piątej doby był alkaliczny w zakresie pH 8,6–9,3, a następnie obojętny (pH 7,1) Odczyn kompostu kontrolnego przez cały czas był w zakresie obojętnym pH 6,7–7,6 (Rys. 2). Druga inokulacja kompostu w 34 dobie kompostowania okazała się zbędna, gdyż po wprowadzeniu szczepionki przemiany zaktywowane były tylko przez dwie doby.

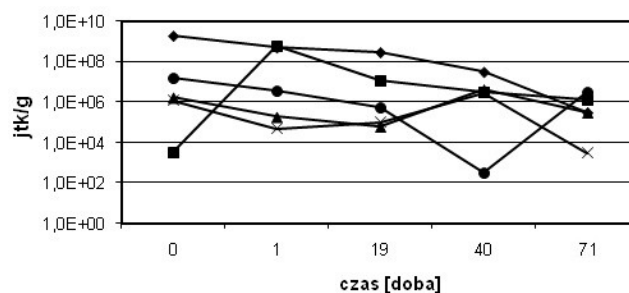


Rys. 2. Zmiany temperatury i pH podczas kompostowania piór kurzych: kompost badawczy ■, kompost kontrolny ■, temperatura otoczenia ---

Przytoczone fizyczne i chemiczne parametry kompostowania wynikały z toczących się procesów metabolicznych drobnoustrojów. Wprowadzenie szczepionki bakterii *B. subtilis* P22 do kompostowanej masy spowodowało zmiany profilu mikrobiologicznego oraz wskaźników biochemicznych i chemicznych (Rys. 3, 4). W pierwszych trzech tygodniach trwania procesu, obniżeniu uległa liczba bakterii mezofilnych z  $1 \cdot 10^{10}$  do  $1 \cdot 10^4$  jtk/g w stosunku do kompostu kontrolnego, w którym była ona na wyrównanym poziomie  $1 \cdot 10^9$  jtk/g. Prawdopodobne jest inhibicyjne oddziaływanie wprowadzonego szczepu bakterii na autochtoniczną mikroflorę kompostową. Równocześnie liczba bakterii termofilnych w przeciwieństwie do kontroli, sukcesywnie wzrastała z poziomu  $1 \cdot 10^4$  jtk/g



Rys. 3. Liczebność i skład mikroflory kompostu inokulowanego kulturą *B. subtilis* P22: ♦ – ogólna liczba bakterii, ■ – bakterie termofilne, ▲ – bakterie przetrwalnikujące, × – bakterie proteolityczne, ● – grzyby strzępkowe

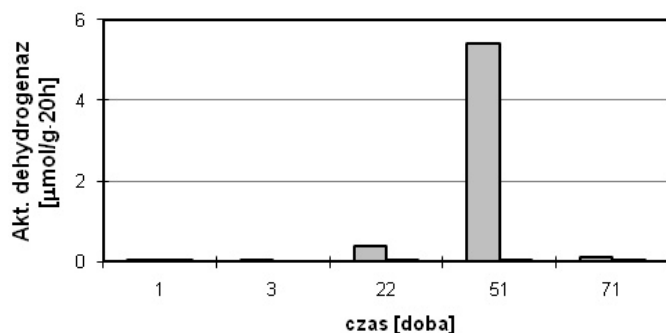


Rys. 4. Liczebność i skład mikroflory kompostu kontrolnego: ♦ – ogólna liczba bakterii, ■ – bakterie termofilne, ▲ – bakterie przetrwalnikujące, × – bakterie proteolityczne, ● – grzyby strzępkowe

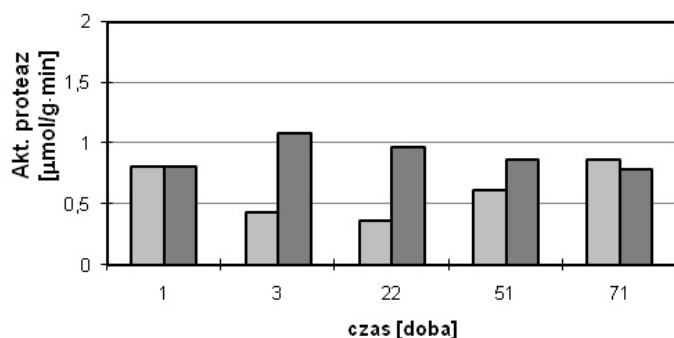
o cztery rzędy logarymiczne. Pomimo tego że szczepionkę stanowiły bakterie przetrwalnikujące o uzdolnieniach proteolitycznych, nie wykazano istotnych różnic w tych grupach mikroorganizmów. Obniżona liczebność grzybów strzępkowych w kompoście badawczym, mogła wynikać z fungistatycznych właściwości bakterii *B. subtilis* P22 [8]. Aktywności enzymatyczne kompostów były kompatybilne ze składem mikroflory, dlatego też były różne w obu kompostach. Ogólnie niewiele wyższą aktywnością proteolityczną charakteryzował się kompost kontrolny, podczas gdy kilkakrotnie wyższą aktywność dehydrogenaz ujawniła się w kompoście badawczym (Rys. 5, 6). Z jednej strony może to sugerować częściową supresję mikroflory kompostu badanego, a z drugiej jego znacznie wyższą aktywność metaboliczną. Potwierdzeniem przyspieszonych przemian kompostu badawczego jest również ubytek masy, który w kontroli wynosił 30%, a w badawczej 46%. Efektem inokulacji wyjściowego materiału kompostowego był także wzrost zawartości składników mineralnych tj. azotu ( $N_{og}$ ) i siarki ( $S_{og}$ ), w porównaniu do kompostu kontrolnego (Tabl. 1). Wzrost zawartości siarki, w którą bogate są keratyny, w kompoście inokulowanym wynosił od 6,1 do 18,5 g/kg, a w kontroli tylko 6,1–7,5 g/kg. Stosunek węgla organicznego

Tablica 1  
Końcowa zawartość składników mineralnych oraz wskaźniki dojrzałości kompostów

	Składniki mineralne					Wskaźniki dojrzałości	
	$C_{org}$	$N_{og}$	$N-NH_4$	$N-NO_3$	$S_{og}$	$C_{org}/N_{og}$	$N-NH_4/N-NO_3$
	g/kg	g/kg	mg/kg	mg/kg	g/kg		
Kompost inokulowany	239	95,9	191	73,7	11,1	2,5	2,6
Kompost kontrolny	282	39,7	229	67,1	7,2	7,1	3,4



Rys. 5. Aktywność dehydrogenaz w kompoście badawczym oraz kontrolnym



Rys. 6. Aktywność proteaz w kompoście badawczym oraz kontrolnym

do azotu ogólnego ( $C_{org}/N_{og}$ ) jest wskaźnikiem dojrzałości kompostu i powinien być na niskim poziomie. W kompoście inokulowanym biopreparatem miał wartość 2,5, natomiast w kontrolnym ustalił się na poziomie 7,1. Dane te potwierdzają wyższy stopień zaawansowania biodegradacji białek keratynowych. Wskaźnik utlenienia mineralnych form azotu

$N-NH_4/N-NO_3$ , obrazuje aktywność nityfikacyjną mikroorganizmów oraz jest ważnym indeksem dojrzałości. W trakcie trwania kompostowania ulegał on powolnemu obniżeniu z 93 do poziomu 2,6–3,4 w obu kompostach. Wartość tego wskaźnika wskazuje na niepełną stabilizację i dojrzałość kompostów. Dziesięciodniowy czas kompostowania wraz z fazą dojrzewania jest typowy dla statycznych systemów z napowietrzaniem. Często jednak konieczne jest wydłużenie czasu samego dojrzewania, co okazało się konieczne w przypadku kompostów badanych. Przeprowadzone badania wykazały, że do efektywnego kompostowania odpadów keratynowych inokulacja biopreparatem jest niezbędna dla prawidłowego przebiegu i zaawansowanej degradacji odpadów keratynowych. Uzyskany kompost badawczy był glebopodobny, jednak zawierał małe fragmenty piór, podczas gdy kontrolny zawierał większe fragmenty oraz wydzieliał ostry zapach amoniaku. W dalszych badaniach kompostowania odpadów keratynowych inokulowanych szczepionką bakteryjną należałoby zmodyfikować technologię procesu.

#### LITERATURA

1. A. Jędrzak: Biologiczne przetwarzanie odpadów, PWN, Warszawa, 2008.
2. A.A. Onifade, N.A. Al-Sane, A.A. Al-Musallam, S. Al-Zarban: *Biores. Technol.* **66**, 1 (1998).
3. J.M. Ichida, L. Krizova, C.A. LeFevre, H.M. Keener, D.L. Elwell, E.H. Burt Jr.: *J. Microbiol. Meth.* **47**, 199 (2001).
4. A. Rodziewicz, W. Łaba: *EJPAU*, **11** (2), #3 (2008).
5. J.N. Ladd, J.H.A. Butler: *Soil Biol. Biochem.* **4**, 19 (1972).
6. L.E. Casida Jr., D.A. Klein, T. Santoro: *Soil Sci.* **98**, 371 (1964).
7. M. Pansu, J. Gautheryrou: *Handbook of Soil Analysis*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2006.
8. W.T. Chang, Y.C. Chen, C.L. Jao: *Biores. Technol.* **98**, 1224 (2007).

**Badania finansowane w ramach projektu rozwojowego przez NCBR NR 12 0010 04, 2008-10.**

Redakcja czasopisma naukowo-technicznego

## INŻYNIERIA I APARATURA CHEMICZNA

uprzejmie informuje, że może sprzedać zainteresowanym różne

### NUMERY ARCHIWALNE

Zamówienia pisemne (faksem lub pocztą) można składać pod adresem

Redakcja „Inżynierii i Aparatury Chemicznej”

44-100 Gliwice, ul. Górnych Wałów 25

skr. poczt. ☒ 4a fax 032 231 94 39