

ANNA RODZIEWICZ
 WOJCIECH ŁABA
 JUSTYNA SOBOLCZYK

Wydział Nauk o Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy, Wrocław

ADAM GRZELAK

Instytut Górniczo Odkrywkowego Poltegor-Instytut, Wrocław

JERZY DROZD

Wydział Przyrodniczo-Technologiczny, Uniwersytet Przyrodniczy, Wrocław

Kompostowanie odpadów keratynowych przy udziale szczepionki bakteryjnej w bioreaktorze obrotowym

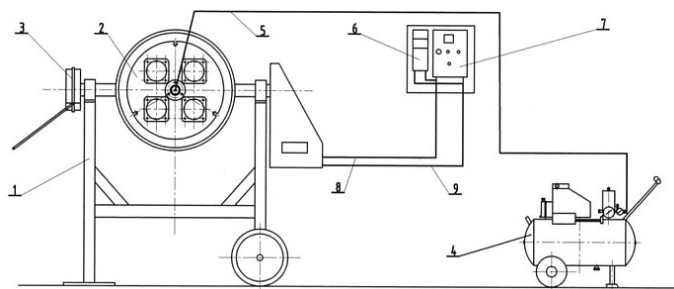
Wstęp

Podstawowym odpadem keratynowym generowanym przez przemysł drobiarski jest pierze. Ponad 90% jego składu stanowią białka keratynowe o złożonej budowie strukturalnej, odporne na działanie czynników fizycznych, chemicznych oraz enzymów proteolitycznych pochodzenia zwierzęcego i roślinnego. W warunkach naturalnych jego biodegradacja trwa od około dwóch do trzech lat. Możliwe jest znaczne przyspieszenie tego procesu z udziałem keratynolitycznych bakterii, które wydzielają pozakomórkowe enzymy o wysokiej specyficzności działania względem keratyn [1]. Indukcja biosyntezy enzymów umożliwiła bakteriom wykorzystanie tych białek jako źródła węgla i azotu, przy braku innych, łatwiej przyswajalnych. Całkowite upłynnienie piór drobiowych przez bakterie *Bacillus subtilis*, *B. cereus* czy *B. polymyxa* podczas ich hodowli w bioreaktorze mieszadłowym, na podłożu mineralnym z dodatkiem piór jako jedynego źródła węgla i azotu, następuje po upływie 5–7 doby hodowli [2, 3]. Różne możliwości aplikacyjne uzyskanego hydrolizatu, zachęcają do dalszych badań bakteryjnej keratynolizy.

Celem badań przedstawionej pracy była ocena keratynolitycznych uzdolnień szczepu bakterii *B. subtilis* P22 w warunkach kompostowania natywnych piór kurzych metodą dynamiczną w bioreaktorze obrotowym.

Materiały i metody

Kompostowanie prowadzono w skali półtechnicznej, dynamiczną metodą okresową, w systemie zamkniętego bębnowego reaktora obrotowego (Rys.1) o pojemności całkowitej 200 dm³ (wymiary bębna: średnica 770 mm, długość 850 mm, średnica otworu zasypowego 390 mm). Reaktor zaopatrzony był w hermetyczną pokrywę z filtrami węglowymi eliminującymi odory. Układ wyposażony był w wentylację wymuszoną za pośrednictwem kompresora HL 275/50 (30 m³ na dobę). Szybkość obrotów bębna wynosiła 8/min. 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 któ-



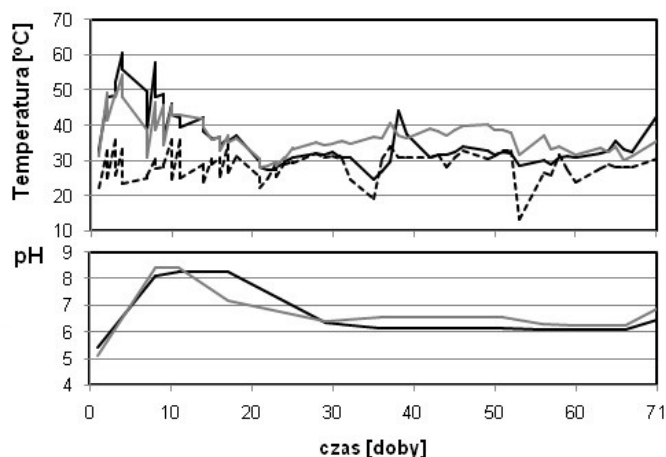
Rys. 1. Schemat reaktora obrotowego; 1 - reaktor; 2 - pokrywa reaktora; 3 - mechanizm wychylenia; 4 - agregat sprężarkowy; 5 - przewód zasilający powietrzem; 6 - przetwornice częstotliwości; 7 - skrzynka sterownicza; 8 - przewody elektryczne; 9 - przewody sterownicze

rych jeden zaszczepiany był płynną kulturą bakterii *Bacillus subtilis* P22 w ilości 7%, w czasie zerowym oraz w 37 dobie procesu (kompost badawczy), natomiast drugi stanowił kontrolę, w której proces zachodził przy udziale autochtonicznej mikroflory, bez inokulacji szczepionką (kompost kontrolny). 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: ogólną liczbę bakterii na zagarowanym bulionie z glukozą w temperaturze 30°C, bakterie termofilne na tym samym podłożu, ale w temp. 55°C, drobnoustroje proteolityczne na agarze mlecznym w temp. 30°C, bakterie przetrwalnikujące na bulionie z glukozą preinkubowane przez 10 minut w temp. 80°C, a następnie inkubowane w temp. 30°C, grzyby strzępkowe na pożywce PDA, inkubowane w temp. 25°C. Wyniki wyrażano jako jednostki tworzące kolonie na 1 gram s.m. kompostu (jtk/g). **Analizy biochemiczne** dotyczyły aktywności enzymów proteolitycznych i dehydrogenaz. Aktywność proteolityczną oznaczano zmodyfikowaną metodą *Ladd i Butler* [4] wobec kazeiny i wyrażano w jednostkach aktywności, przyjmując że jedna jednostka odpowiada ilości mikromoli tyrozyny na 1 minutę, w przeliczeniu na 1 g s.m. kompostu. Aktyw-

ność dehydrogenaz wyznaczano metodą *Casida* i wsp. [5] względem chlorku 2,3,5-trifenylo tetrazoliowego (TTC). Za jednostkę aktywności przyjęto ilość mikromoli powstałego 1,3,5-trifenyloformazanu (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) spektrofotometrycznie, siarkę ogólną (S_{og}) w aparacie CS-MAT. Węgiel organiczny (C_{org}) badano metodą oksydometryczną z użyciem $K_2Cr_2O_7$ oraz frakcję węgla rozpuszczalnego w wodzie (C_w) według [6]. **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.

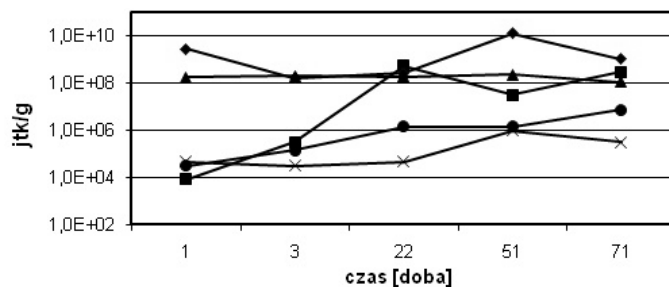
Wyniki i dyskusja

Proces kompostowania obejmuje szereg tlenowych przemian biochemicznych prowadzonych przez mikroorganizmy kolonizujące materiał kompostowy. Jednak kompostowanie odpadów trudno degradalnych wymaga dodatkowych zabiegów ułatwiających jego dostępność na przykład rozdrabniania, czy mieszania i napowietrzania. Odpady keratynowe np. pióra kurze w warunkach statycznych ulegały biodegradacji, jednak z udziałem szczepionki keratynolitycznych bakterii oraz dodatkowego napowietrzania, po trzytygodniowej fazie termicznej przechodziły do fazy przemian i dojrzewania [7]. Zastosowanie szczepionki bakterii *Bacillus subtilis* P22 do kompostowania natywnych piór metodą dynamiczną spowodowało inny przebieg procesu. Faza termiczna trwała od drugiej do ósmej doby (temp. 51–61°C), po niej była dziewięciodobowa faza kompostowania właściwego (temp. 35–42°C) oraz od 20 do 70 doby faza dojrzewania, w której utrzymywała się temp. około 30°C (Rys. 2). Kompostowanie kontrolne miało nieprawidłowy przebieg, gdyż faza termiczna (54°C) wystąpiła tylko w trzeciej dobie, a po niej nastąpił etap, w którym temperatura cały czas była na poziomie 30–45°C aż do zakończenia badań. Odczyn środowiska inokulowanego kompostu w fazie intensywnych przemian był alkaliczny (pH 8,3), natomiast po czterech tygodniach ustabilizował się na poziomie pH 6,1–6,4. W kompoście kontrolnym również pH było początkowo alkaliczne, a następnie w zakresie pH

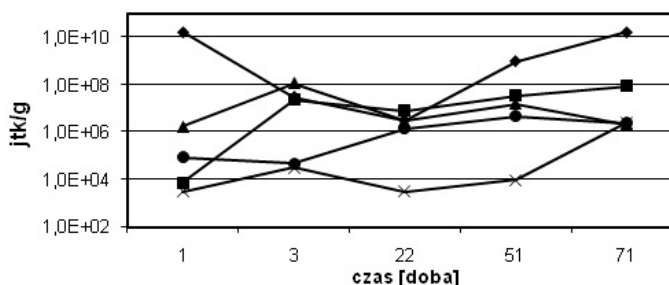


Rys. 2. Przebieg zmian pH i temperatury w trakcie procesu kompostowania: kompost badawczy ■, kompost kontrolny ■, temperatura otoczenia ---

6,3–6,9. Przytoczone informacje sugerują postępującą keratynolizę piór w kompoście badawczym oraz znacznie mniejszą intensywność przemian w kontroli. Ogólna liczba bakterii inokulowanego kompostu była wyższa niż kontrolnego i utrzymywała się na poziomie $1 \cdot 10^8$ jtk/g do $1 \cdot 10^{10}$ jtk/g, podczas gdy w kontroli w ciągu pierwszych trzech tygodni sukcesywnie obniżyła się o cztery rzędy logarytmiczne, po czym nastąpił jej powolny przyrost (Rys. 3 i 4). Liczebność pozostałych grup bakterii: przetrwalnikujących, termofilnych i proteolitycznych w kompoście badawczym zwiększała się od wyjściowej liczby $1 \cdot 10^4$ jtk/g do $1 \cdot 10^6$ jtk/g. W kompoście



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

kontrolnym wahania były większe, jednak ogólną tendencją było zwiększenie liczby bakterii pod koniec badań, od 50 doby trwania procesu. Można przypuszczać że autochtoniczna mikroflora po długim okresie adaptacji, przy wspomaganie procesu ciągłym mieszaniem w bioreaktorze obrotowym, dopiero po 70 dobach jego trwania rozpoczynała fazę intensywnych przemian. Inokulacja kompostowanych piór kurzych szczepionką bakterii *B. subtilis* P22 przyspieszyła do trzech tygodni biodegradację keratyn w bioreaktorze obrotowym. Po takim czasie kompostowany materiał był gotowy do etapu dojrzewania i nie zmieniła tego dodatkowa inokulacja w siódmym tygodniu trwania procesu. Dominacja bakterii w kompostach nie wpływała na liczebność grzybów strzępkowych, których ilość była zbliżona w obu obiektach od $1 \cdot 10^4$ jtk/g do $1 \cdot 10^7$ jtk/g, przy czym w końcowej fazie kompostowania ze szczepionką ich ilość zwiększała się, a w kontroli miała tendencję spadkową. Białkowy charakter kompostowanych odpadów indukował rozwój mikroorganizmów proteolitycznych, a także wydzielanie pozakomórkowych proteaz, co szczególnie widoczne było w kompoście badawczym, gdzie liczba bakterii i aktywność enzymów utrzymywały się z tendencją zwię-

Tablica 1

Końcowa zawartość składników mineralnych oraz wskaźniki dojrzałości kompostów

	Składniki mineralne					Chemiczne wskaźniki dojrzałości		
	C_{org}	C_w	N_{og}	$N-NH_4$	$N-NO_3$	C_{org}/N_{og}	$N-NH_4/N-NO_3$	C_w/C_{org}
	g/kg	g/kg	g/kg	mg/kg	mg/kg			
Kompost inokulowany	214,1	2,71	24,3	466,4	1280	8,8	0,36	1,27
Kompost kontrolny	220,3	2,27	20,3	647,2	870	10,9	0,74	1,03

kszającą, natomiast liczba proteolitycznych bakterii w kontroli zmniejszała się (Rys. 3 i 4). Po reinokulacji kompostu szczepionką mezofilnych bakterii proteolitycznych, aktywność proteolityczna kompostu zwiększała się. W fazie termicznej, w której nasilone są procesy degradacyjne aktywność proteaz kompostu inokulowanego wynosiła 4,0 J/g, zaś kontrolnego 3,1 J/g. Po zakończeniu fazy termicznej aktywność proteaz w obu kompostach uległa obniżeniu do 0,4–0,6 J/g (Rys. 5). Aktywność dehydrogenaz w kompoście badawczym była wysoka tylko na początku (2,3 J/g), natomiast w kontrolnym utrzymywała się dłużej, bo przez 3 tygodnie (5,7 J/g), czyli w tak zwanej długiej fazie adaptacyjnej (Rys. 6). Można sądzić że niższa ogólna aktywność metaboliczna mikroflory badawczego kompostu mogła być spowodowana antagonizmem bakterii *B. subtilis* P22 w stosunku innych grup drobnoustrojów bytujących w kompoście, czego wynikiem był spadek ich liczebności i aktywności metabolicznej.

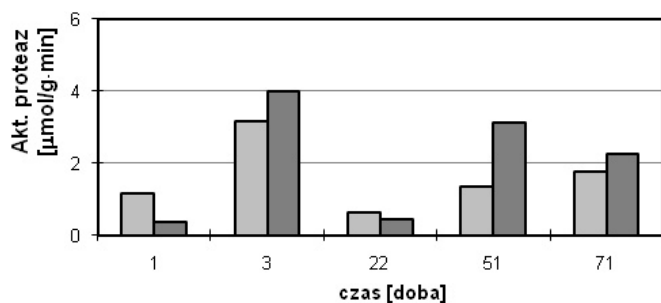
tość składników mineralnych w kompoście oraz wskaźniki jego dojrzałości (Tabl. 1). W kompoście badawczym wyższy był przyrost azotu ogólnego (N_{og}) i rozpuszczalnej w wodzie frakcji węgla (C_w), co następuje kosztem spadku ilości węgla organicznego, więc świadczy o bardziej zaawansowanym rozkładzie trudno degradowalnej keratyny piór. Jednocześnie, okresowy wzrost odczynu środowiska powyżej pH 8,0, głównie w fazie termicznej, mógł zaburzać proces biotransformacji i powodować straty azotu w postaci uwalnianego amoniaku. Inokulacja wyraźnie wpłynęła na zawężenie wskaźnika C_{org}/N_{og} , co wskazuje na daleko zaawansowane procesy stabilizacji kompostu. Jednocześnie w kompoście kontrolnym wskaźnik ten pozostawał powyżej wartości 10, co oznacza brak jego dojrzałości. Wyraźny jest wpływ inokulacji na przemiany amonowych form azotu do azotanów. Zawartość azotanów w kompoście badawczym przewyższała o 38% ich stężenie w kontroli, a stopień utlenienia mineralnych form azotu opisany zależnością $N-NH_4/N-NO_3$ wykazywał dwukrotnie niższą wartość. Po zakończeniu kompostowania w 71 dobie jego trwania w kompoście kontrolnym pozostały nierozłożone fragmenty piór, a jego struktura była kleista, podczas gdy w kompoście badawczym inokulowanym szczepionką bakterii struktura masy była puszysta, jednolita i gębopodobna.

Przedstawione wyniki potwierdzają wcześniejsze badania własne i innych autorów [7, 8], że efektywne kompostowanie odpadów keratynowych możliwe jest tylko z udziałem szczepionki keratynolitycznych drobnoustrojów, co powinno być wspomagane technologicznie. Proces niekontrolowany przebiega nieprawidłowo, więc uzyskany produkt nie osiąga właściwości charakteryzujących kompost.

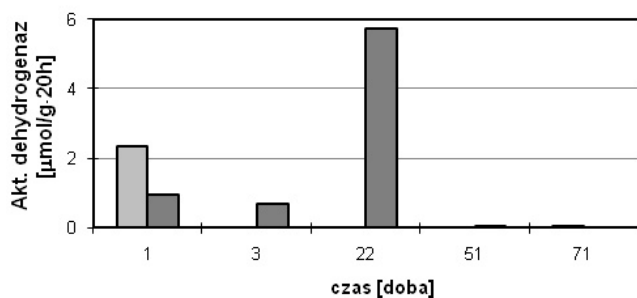
LITERATURA

1. A. Rodziewicz, W. Łaba: *Biotechnologia*, **2** (73), 130 (2006).
2. A. Rodziewicz, K. Baranowska, W. Łaba, J. Sobolczyk: *Acta Sci. Pol. Biotechnol.* **1-2** (5), 61 (2006).
3. W. Łaba, A. Rodziewicz, A. Kancelista, K. Baranowska: *Biotechnology 2006*, Scientific Pedagogical Publishing, Č. Budějovice, Czech Republic. 872 (2006).
4. J.N. Ladd, J.H.A. Butler: *Soil Biol. Biochem.* **4**, 19 (1972).
5. L.E. Casida Jr., D.A. Klein, T. Santoro: *Soil Sci.* **98**, 371 (1964).
6. M. Pansu, J. Gautheryrou: *Handbook of Soil Analysis*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2006.
7. A. Rodziewicz, W. Łaba: *EJPAU*, **11** (2), #3 (2008).
8. J.M. Ichida, L. Krizova, C.A. LeFevre, H.M. Keener, D.L. Elwell, E.H. Burt Jr.: *J. Microbiol. Meth.* **47**, 199 (2001).

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



Rys. 5. Aktywność proteaz w kompoście badawczym ■ oraz kontrolnym ■



Rys. 6. Aktywność dehydrogenaz w kompoście badawczym ■ oraz kontrolnym ■

Wprowadzenie szczepionki bakteryjnej do kompostu oraz jej udział w keratynolizie znacznie zdynamizowało procesy degradacyjne, a następnie mineralizację, co obrazuje zawar-