

Krzysztof CYBULSKI, Anna RODZIEWICZ, Anna CHOIŃSKA

e-mail: cybulski.krzysiek@gmail.com

Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Wydział Nauk o Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy, Wrocław

Dobór warunków kompostowania szczeciny przy udziale szczepionki drobnoustrojowej

Wstęp

Oszczędność energii i recykling odpadów organicznych wraz z ciągłym wzrostem ich ilości zmuszają do szukania alternatywnych form ich przetwarzania. Jedną z możliwości zagospodarowania odpadów keratynowych, w tym także szczeciny, jest poddanie ich procesowi kompostowania [Brandelli, 2008]. Kompostowanie jest naturalnym procesem rozkładu materii organicznej pozwalającym dodatkowo uzyskać bogaty w składniki odżywcze materiał końcowy. Zastosowanie takiego kompostu jako nawozu organicznego pociąga za sobą wiele korzyści środowiskowych takich, jak: przyspieszony wzrost roślin, wzbogacenie gleby w materię organiczną, poprawa zdolności gleby do utrzymywania wilgoci i opóźnienie jej erozji [Liang i inni, 2003]. Kompostowanie szczeciny jest trudnym wyzwaniem za względu na budowę strukturalną keratyn. Alfa-keratyny charakteryzują martwe przydatki skóry, których są głównym składnikiem oraz wykazują dużą homologię do cytokeratyn. Z prawoskrętnych helis α formowane są lewoskrętne superhelisy, czyli protofibryle. Z protofibryli na skutek asocjacji tworzą się mikrofibryle a następnie makrofibryle, które zanurzone są w macierzy. Ostatecznie zostają umieszczone w wydłużonych i dachówkowato ułożonych komórkach. Jest to charakterystyczny model budowy włosów, wełny i szczeciny [Rodziewicz i inni, 2006]. Znaczna zawartość „twardych” α -keratyn, których cząsteczki są mocno stabilizowane wiązaniami wodorowymi, S-S, a także hydrofobowy charakter włókien sprawiają, że substraty takie jak szczecina świńska są trudno degradowane w przeciwieństwie do pierza zawierającego głównie keratynę w formie beta [Fudge i inni, 2009]. Aby efektywnie przeprowadzić proces kompostowania odpadów keratynowych niezbędne jest dobranie optymalnego składu masy kompostowej, metody kompostowania oraz odpowiedni dobór drobnoustrojów o uzdolnieniach keratynolitycznych co jest przedmiotem niniejszych badań.

Materiały i metody

Materiał badawczy stanowiła natywna szczecina świńska pochodząca z ubojni, dodatkowo rozdrobniona. Pozostałe składniki masy kompostowej to wiórki drzewne lub słoma zbożowa, pył węgla brunatnego oraz granulowane odchody kurze (kurzeniec). Szczepionkę stanowiły cztery izolaty kompostowe pochodzące z kolekcji własnej Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu: *Bacillus cereus* B5e/sz, *B. licheniformis* K20, *Trichoderma* sp. K1, *Streptomyces* sp. K2. Szczepionkę stosowano w postaci świeżej biomasy lub utrwalonej przez liofilizację (bakterie), a także suszenie (grzyby i promieniowce).

Kompostowanie prowadzono w dwóch skalach wielkości.

W skali laboratoryjnej proces przebiegał w kolbach Rouxa. W skład masy kompostowej (70–100 g) wchodziły: 1 – rozdrobniona szczecina, słoma lub wiórki drzewne oraz pył węgla brunatnego w stosunku 5:4:1, 2 – rozdrobniona szczecina, słoma, pył węgla brunatnego oraz kurzeniec, w stosunku 5:2:1:2 (Tab. 1). Komposty były inokulowane szczepionką, którą stanowiły bakterie z rodzaju *Bacillus* w formie świeżej biomasy, grzyby strzępkowe *Trichoderma* sp. i promieniowce *Streptomyces* sp. w postaci zmywu z hodowli płytkowej. Kompostowanie trwało 50 dób.

Tab. 1. Skład masy kompostowej w kolbach Rouxa

Kompost	Zawartość procentowa składników (% masowe)				
	szczecina	słoma	wiórki	kurzeniec	węgiel brunatny
szczecina, słoma	50	40	–	–	10
szczecina, wiórki	50	–	40	–	10
szczecina, słoma (sterylna)	50	40	–	–	10
szczecina, słoma, kurzeniec	50	20	–	20	10

W skali półtechnicznej kompostowanie przeprowadzono w bioreaktorach mieszadłowych o pojemności całkowitej 200 dm³ z prędkością mieszania 5 rpm i okresowym napowietrzaniem. We wszystkich kompostach stosunek masowy szczeciny do pozostałych składników wynosił 1:1 (Tab. 2). Kompost inokulowany szczepionką czteroorganizmową nieutrwaloną szczepiono trzykrotnie: w pierwszej dobie procesu bakteriami *B. cereus* B5e/sz, w siódmej dobie bakteriami termofilnymi *B. licheniformis* K20 i w 20. dobie grzybami strzępkowymi *Trichoderma* sp. K1 oraz promieniowcami *Streptomyces* sp. K2. Kompost inokulowany szczepionką utrwaloną również zaszczepiono trzykrotnie: w pierwszej dobie procesu bakteriami *B. cereus* B5e/sz, w siódmej dobie bakteriami termofilnymi *B. licheniformis* K20 i w 16 dobie grzybami strzępkowymi *Trichoderma* sp. K1 i promieniowcami *Streptomyces* sp. K2. Kompostowanie mieszanki 1 trwało 82 doby, w tym 41 dób w reaktorze i 41 dób na pryzmie; mieszanki 2–111 dób, w tym 41 dób w reaktorze oraz 70 dób na pryzmie.

Tab. 2. Skład masy kompostowej w bioreaktorach

Wariant	Ilości oraz forma składników kompostu				Szczepionka	C : N
	szczecina (40 kg)	słoma (pocięta)	kurzeniec (granulat)	węgiel brunatny (pył)		
1	rozdrobniona	16 kg	16 kg	8 kg	4-organizmowa nieutrwalona	23
2	rozdrobniona	32 kg	–	8 kg	4-organizmowa utrwalona	25
K*	rozdrobniona	16 kg	16 kg	8 kg	–	23

* K – kontrola

Przebieg procesu kompostowania w obydwu skalach monitorowano poprzez pomiar temperatury masy kompostów, pH, wilgotności i ubytku masy.

Metody analityczne. Co siedem dób prowadzono analizę kompostu pod kątem aktywności enzymatycznej proteaz i dehydrogenaz. Aktywność proteaz badano metodą Ladda i Butlera z zastosowaniem kazeiny jako substratu. Aktywność proteolityczną kompostów wyrażono w jednostkach proteolitycznych (JP/g) stanowiących ilość mikromoli tyrozyny utworzonej w czasie 1 min na 1 g s.m. kompostu. Aktywność dehydrogenaz analizowano metodą Cassida [Brzezińska i Włodarczyk, 2005]. Aktywność dehydrogenaz w kompoście wyrażono w jednostkach JD/g stanowiących ilość mikromoli TPF utworzonego w czasie 20 h na 1 g s.m. kompostu.

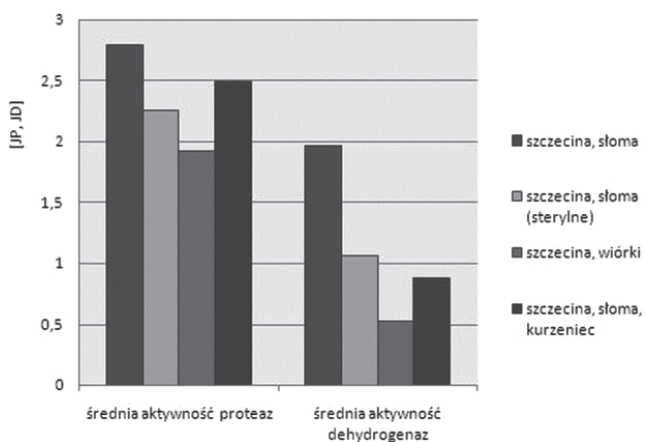
Posiewy mikrobiologiczne. W kompostach oznaczano ogólną liczbę bakterii, liczbę bakterii termofilnych, proteolitycznych i przetrwalnikujących, a także liczebność promieniowców i grzybów strzępkowych. Próbę kompostu o masie 8 g wytrząsano w 100 mL sterylnego płynu fizjologicznego przy 180 rpm przez 20 minut. Następnie sporządzano serię dziesiętnych rozcieńczeń i posiewano powierzchniowo po 0,1 mL na płytkę *Petrie*go z odpowiednim podłożem. Bakterie mezofilne, przetrwalnikujące i termofilne posiewano na podłoże z bulionem i glukozą, bakterie proteolityczne na podłoże z mlekiem i agarem, grzyby strzępkowe na podłoże PDA, promieniowce na podłoże *Cyganowa*.

Wyniki i dyskusja

Kompostowanie w skali laboratoryjnej

Badania przeprowadzone przez wielu autorów wskazują jednoznacznie na keratynolityczne właściwości bakterii z rodzaju *Bacillus* [El-Refai i in., 2005], grzybów strzępkowych [Gradisar i in., 2005] oraz promieniowców [Ignatova i in., 1999]. Uzasadnionym wobec tego wydaje się zastosowanie skojarzonej szczepionki tych mikroorganizmów w kompostowaniu szczeciny.

Istotnym wskaźnikiem przemian zachodzących podczas procesu kompostowania jest poziom aktywności kluczowych enzymów odpowiedzialnych za rozkład materii organicznej. W przypadku substratu jakim jest szczecina monitorowano aktywność proteaz oraz dehydrogenaz. Zdecydowanie wyższe wartości aktywności poszczególnych enzymów odnotowano w mieszankach zawierających słomę i szczecinę inokulowanych szczepionką oraz równocześnie szczepionką i kurzeńcem. Średnia aktywność proteaz była na poziomie 2,5 oraz 2,8 JP a dehydrogenaz – odpowiednio 1,96 i 0,87 JD (Rys. 1).

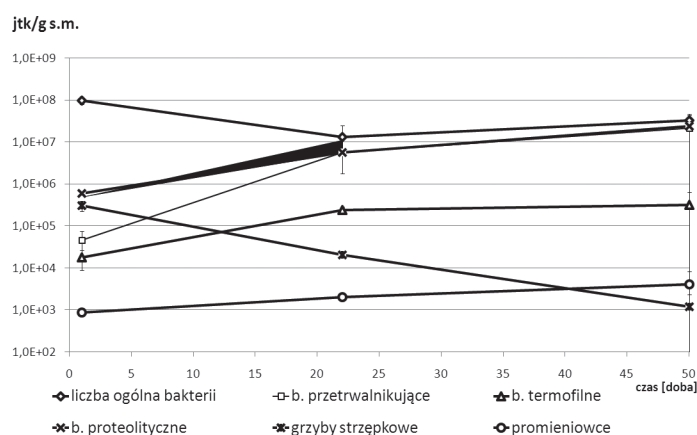


Rys. 1. Aktywność proteaz i dehydrogenaz w kompostach laboratoryjnych inokulowanych 4-organizmową szczepionką

Porównując komposty inokulowane szczepionkami, najmniejszymi wartościami aktywności enzymatycznych charakteryzowała się mieszanka szczeciny i wiórków (1,93 JP, 0,53 JD). Może to być spowodowane inhibitoryjnym wpływem na mikroflorę związków lotnych znajdujących się w trocinach, szczególnie pochodzących z drzew iglastych. Kolejnym zaszczipionym kompostem była mieszanka sterylizowanej wstępnie szczeciny i słomy. Nieco niższe aktywności enzymatyczne oraz wartość *pH*, w porównaniu do kompostów z niesterylnym substratem, pozwala wysnuć wniosek o pozytywnej roli mikroflory autochtonicznej w procesie kompostowania szczeciny. Ponadto wyniki badań sugerują, że wstępna obróbka termiczna szczeciny nie zwiększyła jej podatności na hydrolizę enzymatyczną.

Charakterystyczną cechą wszystkich kompostów był wzrost odczynu środowiska do wartości powyżej *pH* 8,0 już w ósmej dobie procesu, co było skutkiem intensywnego wydzielania amoniaku. Odczyn kompostów do końca procesu utrzymywał się w granicach *pH* 8,3–9,0.

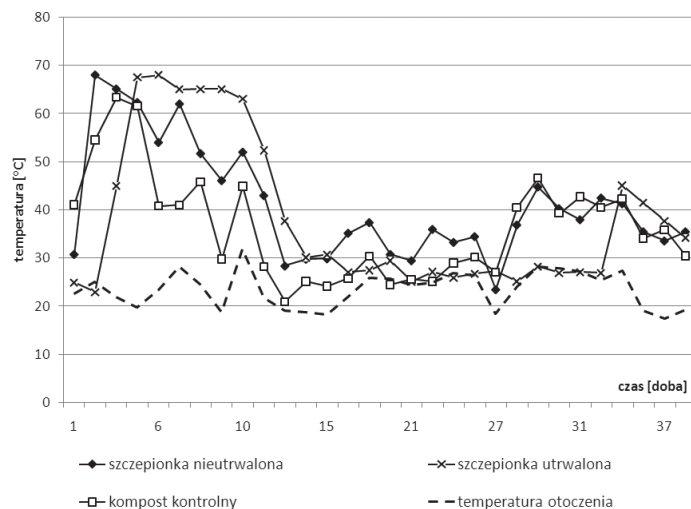
Na wielokierunkowe przemiany zachodzące podczas kompostowania wskazuje temperatura mieszanki podczas procesu. Ze względu na małą masę kompostów laboratoryjnych (100 g), a tym samym ich pojemność cieplną, masa mieszanek podczas kompostowania nie przekroczyła 32°C. Natomiast różnica temperatur pomiędzy kompostami inokulowanymi, a kompostem kontrolnym wynosiła średnio 4°C. W przeciwieństwie do kompostu kontrolnego w kompostach badawczych nastąpił wzrost liczebności bakterii proteolitycznych od 10⁶ do 10⁷ jtk/g, termofilnych od 10⁴ do 10⁵ jtk/g, przetrwalnikujących od 10⁵ do 10⁶-10⁷ jtk/g przy jednoczesnym nieznacznym spadku liczby mezofili, co przełożyło się na wysokie aktywności enzymatyczne w tych mieszankach (Rys. 2). Ostatnim badanym parametrem był ubytek masy kompostów po 50 dobach. Największym ubytkiem charakteryzowały się komposty zawierające w swoim składzie szczecinę i słomę inokulowane szczepionką – 31,1% oraz szczepionką i dodatkowo kurzeńcem – 29,9%. Uzyskane wyniki badań laboratoryjnych zadecydowały o wyborze tych obiektów do przeprowadzenia kompostowania w skali półtechnicznej.



Rys. 2. Zmiany liczebności poszczególnych grup mikroorganizmów w kompostach laboratoryjnych

Kompostowanie w skali półtechnicznej

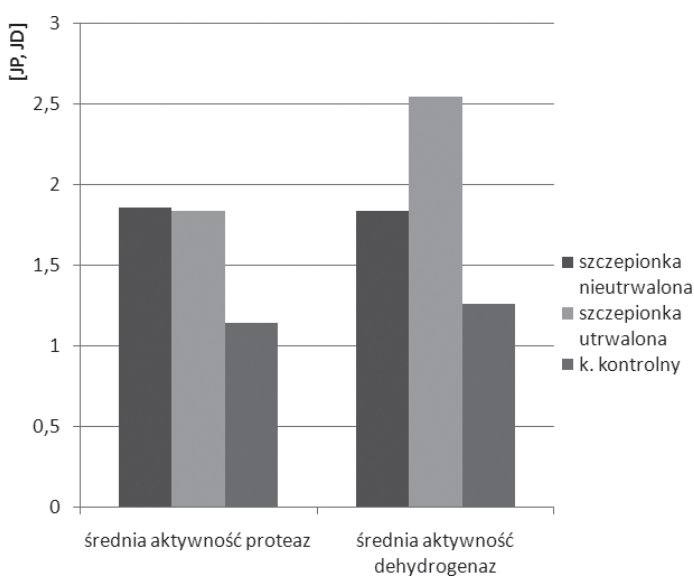
Efekt kompostowania zależy w dużej mierze od ilości i proporcji komponentów. Większa masa mieszanek w skali półtechnicznej (Tab. 2) spowodowała większe zmiany temperatury podczas trwania procesu. Maksymalna temperatura kompostu w skali półtechnicznej wynosiła 68°C i była o 36°C wyższa od maksymalnej temperatury kompostów laboratoryjnych (Rys. 3). W kompostach inokulowanych szczepionkami wykazano charakterystyczny profil zmian temperatury z wyraźnie zaznaczoną fazą termofilną.



Rys. 3. Zmiany temperatury mieszanek kompostowanych w skali półtechnicznej inokulowanych szczepionką

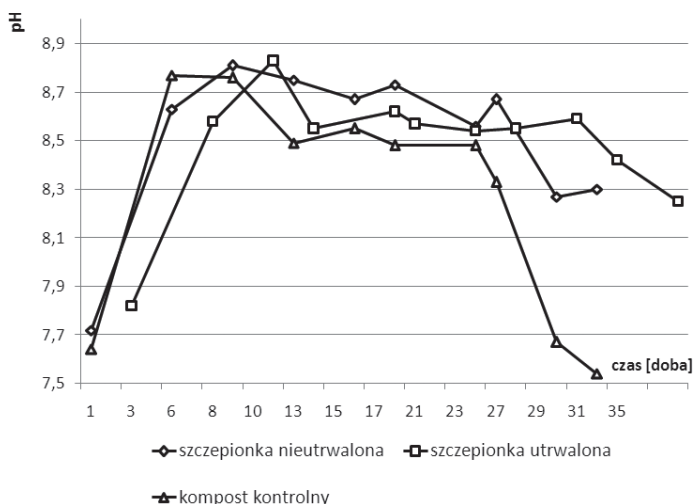
Podobny profil temperaturowy został uzyskany w pracy [Rodziewicz i inni, 2009] podczas kompostowania odpadów keratynowych w postaci poubojowego pierza w zamkniętym bioreaktorze statycznym. Cechą charakterystyczną kompostów badawczych była długa, siedmiodobowa faza termofilna, podczas której wartość temperatury przekraczała 50°C.

Średnia temperatura kompostów badawczych wynosiła odpowiednio 41,4°C dla wariantu 1 (Tab. 2) oraz 37,5°C dla wariantu 2 i była wyższa w porównaniu do temperatury kompostu kontrolnego (36,4°C). Podwyższona temperatura mogła być wynikiem wzmożonej aktywności metabolicznej drobnoustrojów. Średnia aktywność proteaz w zaszczipionych kompostach była o 0,7 JP wyższa od tej w kompoście kontrolnym. Podobnie aktywność dehydrogenaz, która była wyższa odpowiednio o 0,6 i 1,3 JD w kompostach z inokulum nieutrwalonym i utrwalonym w stosunku do kompostu kontrolnego (Rys. 4).



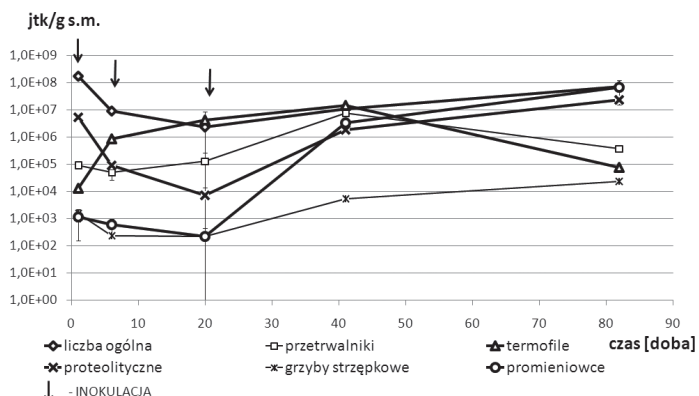
Rys. 4. Aktywność enzymatyczna kompostów prowadzonych w skali półtechnicznej z udziałem szczipionki drobnoustrojów

Podwyższenie efektywności rozkładu szczeciny przy użyciu szczipionki miało odzwierciedlenie także w odczynie środowiska mieszanek podczas procesu. Ogólnie wyższymi wartościami pH charakteryzowały się komposty badawcze (Rys. 5).



Rys. 5. Zmiany odczynu kompostów prowadzonych w skali półtechnicznej inokulowanych szczipionką 4-organizmową

Liczebność poszczególnych grup mikroorganizmów na przykładzie kompostu inokulowanego nieutrwaloną szczipionką przedstawiono na rys. 6.



Rys. 6. Liczebność poszczególnych grup mikroorganizmów w kompoście inokulowanym szczipionką 4-organizmową nieutrwaloną

Siedmiodobowa faza termofilna przyczyniła się do charakterystycznych zmian w liczebności mikroorganizmów w tej fazie kompostowania. W pierwszych dwudziestu dobach zanotowano spadek ilości bakterii mezofilnych do 10^6 jtk/g i proteolitycznych do 10^4 jtk/g a także promieniowców i grzybów strzępkowych do 10^2 jtk/g, na które niekorzystnie wpływała podwyższona temperatura. W tym czasie zwiększyła się ilość bakterii termofilnych oraz przetrwalnikujących do 10^7 jtk/g (Rys. 6). Z ich udziałem nastąpił wzmożony rozkład łatwo dostępnych i łatwo degradowalnych źródeł węgla. Miało to odzwierciedlenie w podwyższonej aktywności enzymów oksydoredukcyjnych podczas fazy termofilnej w kompostach badawczych. Rozkład szczeciny, jako trudno degradowanego źródła węgla i azotu, powinien zachodzić w fazie intensywnych przemian. Związane jest to z optymalną temperaturą produkcji keratynaz przez bakterie z rodzaju *Bacillus*, która wynosi 30–50°C [Cheng-gang i in., 2008]. Faza ta trwała w przypadku obydwu kompostów począwszy od 10.–11. doby aż do końca procesu i skutkowała wzrostem ilości bakterii mezofilnych oraz proteolitycznych, a tym samym wzmożoną aktywnością proteaz. Wzrost liczby grzybów strzępkowych i promieniowców w końcowym etapie procesu wynikał zarówno z wprowadzenia ich w postaci szczipionki (w 20. dobie w przypadku inokulum nieutrwalonego i w 16. dobie w przypadku szczipionki utrwalonej) jak również optymalnych do wzrostu warunków (obniżenie pH i temperatury kompostów).

Ubytek masy kompostów oznaczony po zakończeniu procesu wynosił 46,61% w kompoście inokulowanym szczipionką nieutrwaloną oraz 38,14% dla kompostu inokulowanego tą samą szczipionką w postaci utrwalonej. Proporcje węgla i azotu w masie kompostowej zmieniły się z wartości 22,7 do 10,2 w przypadku kompostu inokulowanego szczipionką nieutrwaloną i z 25,3 do 5,4 w przypadku kompostu inokulowanego szczipionką utrwaloną.

Wnioski

Uzyskane wyniki wskazują, że do kompostowania szczeciny niezbędna jest szczipionka keratynolitycznych drobnoustrojów oraz odpowiedni skład masy kompostowej, co jest podstawą prawidłowego przebiegu procesu. Zastosowana w badaniach szczipionka składająca się z bakterii *Bacillus cereus* B5e/sz, *B. licheniformis* K20, grzyba strzępkowego *Trichoderma* sp. K1 oraz promieniowca *Streptomyces* sp. K2 pozwoliła na zwiększenie efektywności rozkładu szczeciny w porównaniu do niezaszczepionego kompostu kontrolnego. Istotną rolę odgrywa również mikroflora autochtoniczna kompostu. Kompost laboratoryjny zawierający w składzie sterylną szczecinę i słomę inokulowany szczipionką charakteryzował się ubytkiem masy wynoszącym 23,1% podczas gdy

ubytek masy dla tej samej, niesterylnej mieszanki z inokulum wynosił 31,3%.

Wykazano, że optymalny skład masy kompostu obejmował 50% rozdrobnionej szczeciny i 50% innych komponentów: słomę, kurzeniec, pył węgla brunatnego w stosunku 1:1:0,5. Dobranie optymalnego składu masy kompostowej jest warunkiem prawidłowego rozwoju mikroorganizmów autochtonicznych oraz wprowadzonych do kompostu w postaci szczepionki, a co za tym idzie znacznej poprawy efektywności procesu. Kompostowanie w skali laboratoryjnej nie odzwierciedla wszystkich procesów mogących zajść w tych samych warunkach w skali półtechnicznej. Wynika to z małej pojemności cieplnej kompostów, co uniemożliwia ważną z punktu widzenia efektywności procesu termofilną fazę kompostowania.

LITERATURA

- Brandelli A. 2008. Bacterial keratinases: useful enzymes for bioprocessing agroindustrial wastes and beyond. *Food Bioprocess Technology*, 1, 105-116. DOI: 10.1007/s11947-007-0025-y
- Brzezińska M., Włodarczyk T., 2005. Enzymy wewnątrzkomórkowych przemian redoks (oksydoreduktazy). *Acta Agrophysica, Rozprawy i Monografie*, 3, 11-26.
- Cheng-gang C., Bing-gan L., Xiao-dong Z. 2008 Keratinase production and keratin degradation by a mutant strain of *Bacillus subtilis*. *Journal of Zhejiang University Science*, 9, nr 1, 60-67.
- El-Refai H.A., AbdelNaby M.A., Gaballa A., El-Araby M.H., Abdel Fatah A.F. 2005. Improvement of the newly isolated *Bacillus pumilus* FH9 keratinolytic activity. *Process Biochemistry*, 40, nr 7, 2325-2332. DOI: 10.1016/j.procbio.2004.09.006
- Fudge D.S., Winegard T., Ewoldt R.H., Beriault D., Szewciw L., McKinley G.H. 2009. From ultra-soft slime to hard a-keratins: The many lives of intermediate filaments. *Integrative and Comparative Biology Advance Access*, 49:1, 32-39. DOI: 10.1093/icb/icip007
- Gradišar H., Friedrich J., Križaj I., Jerala R. 2005. Similarities and specificities of fungal keratinolytic proteases: comparison of keratinase of *Paecilomyces marquandii* and *Doratomyces microsporus* to some known proteases. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, nr 7, 3420-3426. DOI: 10.1016/j.enzymitec.2004.09.015
- Ignatova Z., Gousterova A., Spassov G., Nedkov P. 1999. Isolation and partial characterization of extracellular keratinase from a wool degrading thermophilic actinomycete strain *Thermoactinomyces candidus*. *Canadian Journal of Microbiology*, 45, nr 3, 217-222. DOI: 10.1139/cjm-45-3-217
- Ladd J.N., Butler H.A., 1972. Short term assays of soil proteolytic enzyme activities using proteins and dipeptide derivatives as substrates, *Soil Biol. Biochem.*, 4, 19-30. DOI: 10.1016/0038-0717(72)90038-7
- Liang C., Das K.C., McClendon R.W. 2003. The influence of temperature and moisture contents regimes on the aerobic microbial activity of biosolids composting blend. *Bioresource Technology*, 86, 131-137. DOI: 10.1016/S0960-8524(02)00153-0
- Rodziewicz A., Baranowska K., Łaba W., Sobolczyk J. 2006. Właściwości keratynolityczne oraz tworzenie biofilmu przez bakterie *Bacillus subtilis*. *Acta Scientiarum Polonorum, Biotechnologia*, 5, nr 1-2, 61-73.
- Rodziewicz A., Sobolczyk J., Łaba W., Choińska A., Bubel F., Bekier J. 2009. Wykorzystanie szczepionki drobnoustrojów do kompostowania odpadów keratynowych w bioreaktorze statycznym. *Inż. Ap. Chem.* 48, nr 3, 98-100.

Badania finansowane w ramach projektu rozwojowego przez Naukowe Centrum Badań i Rozwoju nr 12 001004,2008-2010.

CZASOPISMO NAUKOWO-TECHNICZNE

INŻYNIERIA I APARATURA CHEMICZNA

ukazuje się od 1961 roku

Czasopismo jest poświęcone problemom obliczeń procesowych i zagadnieniom projektowo-konstrukcyjnym aparatury i urządzeń stosowanych w przemysłach przetwórczych, w tym szczególnie w przemyśle chemicznym, petrochemicznym, rolno-spożywczym, jak również w energetyce, gospodarce komunalnej i w ochronie środowiska.

Przeznaczone jest zarówno dla pracowników badawczych, projektantów, konstruktorów, jak i dla menadżerów oraz inżynierów ruchomych.

W czasopiśmie publikowane są artykuły o szerokim spektrum tematycznym, obejmującym problematykę procesów i operacji jednostkowych inżynierii chemicznej, bio- i nanotechnologie, inżynierię biomedyczną, recykling, bezpieczeństwo procesowe oraz obliczenia i projektowanie aparatów w aspekcie poprawy wydajności, lepszego wykorzystania surowców, oszczędności energii i ochrony środowiska.

Publikowane prace są recenzowane przez specjalistów. Autorzy artykułów opublikowanych w „Inżynierii i Aparaturze Chemicznej” uzyskują 6 punktów do oceny parametrycznej Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

Czasopismo jest regularnie abstraktowane w CAS (Chemical Abstracts Service – a division of the American Chemical Society, Columbus, Ohio, USA) i jest indeksowane na platformie SciFinder®:

<http://www.cas.org/products/scifindr/index.html>

oraz w Bazie Polskich Czasopism Technicznych – BazTech:

<http://baztech.icm.edu.pl/wysz.html>