

NGUYEN THI BICH LOC*

**EFEKTYWNOŚĆ NIEKTÓRYCH SZCZEPÓW
MIKROORGANIZMÓW W PROCESIE KOMPOSTOWANIA
ODPADÓW PRODUKCJI OWOCÓW I WARZYW***Streszczenie*

Przetwarzanie odpadów z fabryki przetwórstwa warzyw i owoców idzie w kierunku kompostowania (*composting*). Współdziałanie mikroorganizmów w rozkładzie substancji organicznych z dodawaniem trocin w stosunku 1:2. Proces kompostowania trwa 50 dni dla odpadów cebuli i czosnku oraz 30 dni dla odpadów warzyw i owoców. W prowadzonych badaniach dodawano roztwór z wybranymi szczepami mikroorganizmów. Roztwory składały się z trzech szczepów takich jak: bakterie z rodzaju *Bacillus subtilis* (Bk1), promieniowce z rodzaju *Streptomyces griseus* (pr.1) i grzyby z rodzaj, *Aspergillus oryzae* (Grz.1). Wyniki analizy kompostów wykazują, że trzy stosowane szczepy mikroorganizmów posiadają efektywne rozkładania CMC, xelulozy i skrobi, mają zdolność do tworzenia humusów od 90-94% w ciągu 50 dni i 30 dni. Mają wysoki termin przeżycia na pożywkach ze stężeniami antybiotyku (ampicylina od 300 mg do 1000 mg na litr pożywki). Te trzy szczepy należą do grupy mikroorganizmów szybko rosnących (rosną przed 72 godziną hodowania), rosnących w środowisku z szerokimi zakresami pH, od pH =5 do pH = 9. Możemy wykorzystać te szczepy do produkcji roztworów biologicznych. Gotowy produkt kompostów może być używany jako wysokiej jakości nawóz organiczny dla roślin uprawnych.

Słowa kluczowe: odpady, owoce, warzywa, kompost, szczepy mikroorganizmy:
Bacillus subtilis, *Streptomyces griseus*, *Aspergillus oryzae*

WSTĘP

Oczyszczenie odpadów przemysłowych w tym odpadów z fabryki przetwórstwa warzyw i owoców idzie w kierunku kompostowania (*composting*) – działanie mikroorganizmów w rozkładzie substancji organicznej [Jan i in. 1995].

* Uniwersytet Zielonogórski, Instytut Inżynierii Środowiska, Zakład Ekologii Stosowanej

W wyniku tego procesu powstają nawozy organiczne na miejscu, składniki odżywcze wracają do środowiska przyrodniczego, a również zmniejszeniu ulegają dawki nawozów chemicznych. Wiele naukowców z dziedziny: biologii, mikrobiologii, biotechnologii [Nicklin i in. 2004, Nicholas i Cheremisnoff 1996] zaczyna prowadzić badania, szukając czynników wpływających na proces kompostowania i mechanizm przemiany składników celulozowych, w celu zmniejszenia czasu kompostowania i podnoszenia jakości kompostów.

Odpady z fabryki przetwórstwa owoców i warzyw mają czas rozkładu naturalnie krótki, ponieważ zawierają wysoką zawartość wody, składników mineralnych oraz pektyn, celulozy i lignin, dlatego wybrane szczepy mikroorganizmów uczestniczących w produkcji kompostów będą brać udział w procesie szybkiego rozkładu przemiany substancji organicznej trudno rozpuszczalnej. W procesach metabolizmu mikroorganizmy wykorzystują substraty pokarmowe jako źródło energii (katabolizm) oraz do reakcji syntezy materiału komórkowego (anabolizm) [Klimiuk i Łebkowska 2008]. Proces ten również bierze udział w zmniejszeniu stopnia skażenia środowiska. Pod tym względem prowadzimy badania na temat „Efektywności niektórych szczepów mikroorganizmów w procesie kompostowania odpadów z fabryki przetwórstwa owoców i warzyw” w Zielonej Górze, województwa Lubuskiego w okresie od 2008 do 2010 roku.

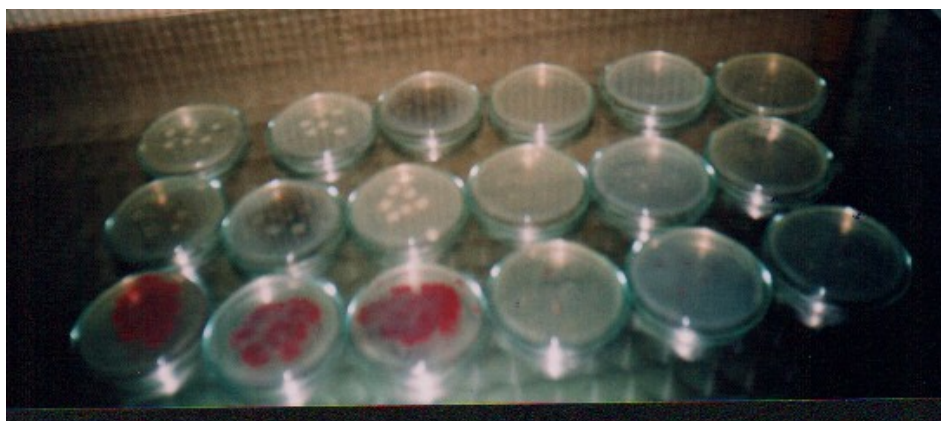
MATERIAŁY I METODY

Materialy

- odpady z przetwórstwa warzyw i owoców (odpady cebuli, czosnku, skóry jabłek, gruszek, ziemniaków, marchwi),
- wybrane trzy szczepy mikroorganizmów: promieniowce z rodzaju *Streptomyces griseus* (Pr.1), grzyby z rodzaju *Aspergillus oryzae* (Grz.1), bakterie z rodzaju *Bacillus subtilis* (Bk1).
- trociny drewniane (albo heblowina) w stosunku 1: 2 (1 trociny 2 odpady), w tym doświadczeniu było użyte trociny.

Metody

- określenie zdolności rozkładania CMC, celulozy i skrobi (wydzielania enzymów: CMA-azy, celulazy, amylazy) przez szczepy mikroorganizmów na pożywkach hodowanych metodą płytkową [Rodina 1968], według metody dyfuzyjno-promieniowania na szalkach Petriego w trzech powtórzeniach [Williams 1983];



Fot. 1. Wzrost szczepów bakterii na pożywce z CMC, celulozą i skrobią
Phot. 1. The growth of bacteria strains in medium with CMC, cellulose and starch

- ocena bezpieczeństwa badanych szczepów mikroorganizmów prowadzona na BSAS – System sprawdzenia bezpieczeństwa mikroorganizmów [BCRC 2011], metodą testową wg wzorów testowych (dla człowieka, zwierząt i roślin);
- ocena niektórych cech badanych szczepów: czas wzrostu na pożywkach stałych, morfologia i rozmiary kolonii, zakres pH odpowiedni dla rozwoju badanych szczepów oraz zdolność przeżywania na substancji antybiotykowej – metodą hodowlaną na szalkach, prowadzono pomiary i opisu [Nowak i in. 1995, Nguyen B.L. 2009];
- określenie zawartości procentowej próchnicy, pH_{KCl} , OC (%), N (%), P_2O_5 (%) i K_2O (%) w próbkach doświadczalnych kompostów i kontrolnych odpadów badanych szczepów według metody o pisanej w Chemii Rolnej [Krzywy i in. 1997].

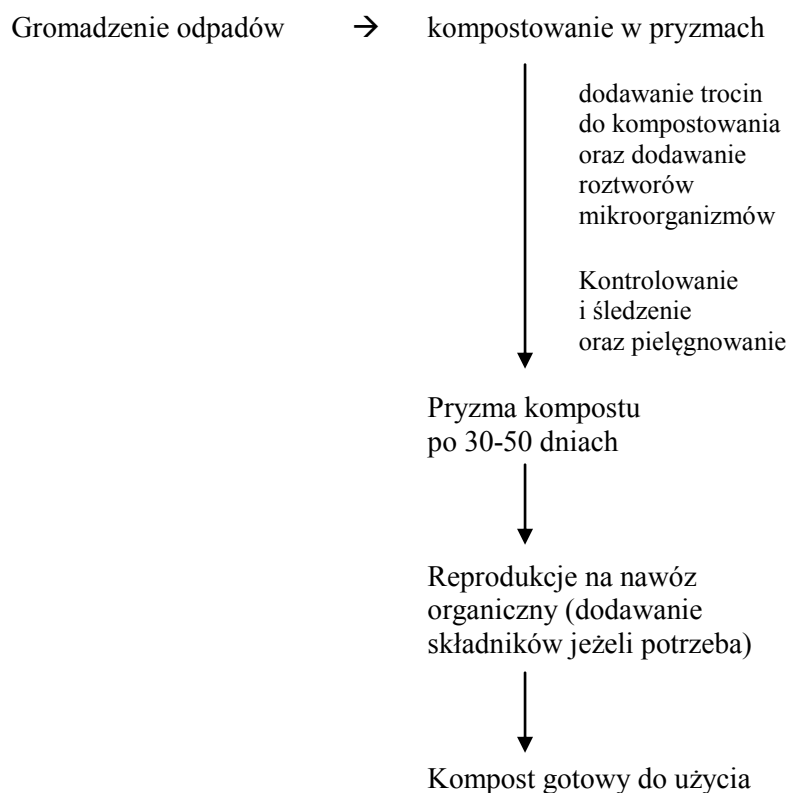
CMC (KMC) – karboksymetyloceluloza, – Carboxymethylcellulose

CMC-aza: enzym karboksymetylocelulolaza – enzyme Carboxymethylcellulase

BSAS – System sprawdzenia szczepów mikroorganizmów zainstalowanych w systemie aktualizacji i podstawowych zabezpieczeń – system of testing safes of microorganism strain – <http://strainbcrc.fidi.org.tw>

OC (%) – organic carbon (węgiel organiczny)

Schemat kompostowania odpadów



WYNIKI BADAŃ

Poniżej przedstawiono wyniki badań testów trzech szczepów mikroorganizmów, używanych do kompostowania odpadów. Oceniono stopień bezpieczeństwa badanych szczepów mikroorganizmów na system BSAS. Okazało się, że są to szczepy nie mające zdolności powodowania chorób człowieka, zwierząt i roślin. Te szczepy należą do grupy bezpiecznych nr 1, więc możemy używać ich do produkcji kompostu. Wyniki badania zdolności przeżywania szczepów na antybiotykach przedstawiono w tabeli 1.

Tab. 1. Zdolność przeżywania szczepów na antybiotykach

Tab. 1. The ability residence of microorganism strains in antibiotic substance

Szczepy mikroorganizmów (Microorganism strains)	Jednostka liczona (The forming units)	Stężenia antybiotyków (mg/litr) (Concentrations of the antibiotic)			
		A300	A500	A800	A1000
<i>Streptomyces griseus</i> (Pr.1)	CFU/mlx10 ⁵	3,50	2,92	2,31	1,57
<i>Aspergillus oryzae</i> (Grz.1)	CFU/mlx10 ⁵	16,50	11,23	8,50	7,40
<i>Bacillus subtilis</i> (Bk.1)	CFU/mlx10 ⁵	9,14,	8,22	7,21	6,17

CFU: liczba jednostek formujących kolonie; CFU: colony forming units

Badania zdolności przeżywania na antybiotykach szczepów mikroorganizmów wykazały, że szczepy, które mają zdolność przeżywania na wysokim stężeniu antybiotyków, to szczepy które będą miały dobrą zdolność przeżywania w warunkach środowiskowych, będą miały dużą zdolność konkurencji w środowisku z innymi szczepami mikroorganizmów. Szczepy te mają większą zdolność przeżywania w środowisku. Wyniki przedstawione w tabeli 1 pokazują, że trzy szczepy badane są odporne na ampicylinę.

Przeprowadzono kompostowanie odpadów z rolnictwa z mieszaniną z trocinami i dodawaniem roztworów mikroorganizmów wyżej opisana metoda. Wyniki analizy po 50 dniach po kompostowania odpadów cebuli i czosnku i po 30 dniach kompostowania odpadów owoców i warzyw wykazały, że te komposty gotowe mają kolor czarny, porowaty, bardzo łatwo rozdrabniają się, procent próchnicy osiąga od 90 do 94%, dlatego komposty te mogą być używane jako nawóz organiczny. W porównaniu z próbą kontrolną kompostowania w takich samych warunkach doświadczalnych bez dodawania mikroorganizmów, procent próchnicy wynosił od 45 do 55 %, kompost ten trzeba poddawać kompostowaniu na dalszy okres. Procent OC (%) w pryzmach kompostowania odpadów cebuli i czosnku był niższy (22,02%) niż w pryzmach przed kompostowaniem i niższy niż w pryzmach kontrolnych (27,13%; 24,18%). Okazało się, że w pryzmach doświadczalnych był dodawany roztwór mikroorganizmów, który powodował silne przemiany składników trudno rozkładalnych na składniki łatwo przyswajalne, skracał się czas procesu kompostowania i zwiększała się zawartość składników mineralnych w kompostach.

Tab. 2. Wyniki analizy materiałów kompostowanych przed i po kompostowaniu
 Tab. 2. The analyzing results of composted material before and after composting process

Wskaźniki analizy (The indication of analysis)	Kompostowanie odpadów cebuli i czosnku z trocinami (The waste composting of onion and garlic with sawdusts)			Kompostowanie odpadów owoców i warzyw z trocinami (The waste composting of fruits and vegetables with sawdusts)		
	Przed kompostowaniem (Before composted)	Po kompostowaniu 50 dni (after composted 50 days)		Przed kompostowaniem (Before composted)	Po kompostowaniu 30 dni (After composted 30 days)	
		Próba kontrola (The control trial)	Próba kompostu (The compost trial)		Próba Kontrola (The control trial)	Próba Kompostu (The compost trial)
Stosunek humusowania (%) (The ratio of humus)(%)	0	45	90	0	55	94
pH _{kcl}	6,73	6,90	7,07	7,06	7,14	7,24
OC(%)	27,13	24,18	22,02	26,18	21,00	18,30
N(%)	0,12	0,28	0,48	0,23	0,43	0,64
P ₂ O ₅ (%)	0,34	0,47	0,66	0,23	0,46	0,64
K ₂ O(%)	1,31	1,41	1,65	1,06	1,31	1,55

Tab. 3. Czas wzrostu i morfologia kolonii szczepów używanych w kompostowaniu
 Tab. 3. The time of growth and the colony morphological of strains, which used in the composting process

Szczepy mikroorganizmów (The microorganism strain)	Czas wzrostu (godz.) (The of growth) (hours)	Średnica kolonii (cm) (The colony diameter)(cm)	Morfologia kolonii po 72 godzinach hodowania (The colony morphological after 72 hours of cultivated)
Pr.1 (Streptomyces griseus)	16	0,6	Kolor szaro-biały, forma jęwabno-aksamitna, sucha. (grey - white colour in the form silk-velvety, drily)
Grz.1 (Aspergillus oryzae)	16	2,5	Kolor złoto-zielony, forma: krótkie nitki (Golden - green colour in the form: thread short)
Bk.1 (Bacillus subtilis)	16	1,5	Kolor biało-mętny, forma wypukła, śluzowata, brzeg gładki (White-muddy colour, in the form bulging, mucous, the smooth edg)

Według tabeli identyfikacji Bergeya [1994], wyniki z tabeli wskazują, że trzy szczepy badane należą do grupy szybko rosnących (przed 72 godz.). Zaczynają rosnąć od 16 godziny hodowania.

Tab. 4. Zdolność wzrostu szczepów badanych na różnych poziomach pH

Tab. 4. The growth abilities of strains, which tested in various of pH horizontal

Szczepy (<i>Strains of microorganism</i>)	Jednostki liczone (<i>The forming units</i>)	pH początkowa (<i>The begining pH</i>)				
		pH=5	pH=6	pH=7	pH=8	pH=9
Pr.1	CFU/mlx10 ⁵	1,70	2,80	2,90	2,00	0,70
Grz.1	CFU/mlx10 ⁵	3,90	6,70	3,30	2,30	2,00
BK.1	CFU/mlx10 ⁵	3,70	5,85	6,50	2,60	1,58

Wyniki z tabeli wykazują, że zdolność wzrostowa szczepów badanych mikroorganizmów jest szeroka wobec różnych poziomów pH (od 5 do 9 pH). Bakterie i promieniowce rozwijają się silnie w środowisku pH w zakresie 6 i 7, a grzyby rozwija się silnie w zakresie pH od 5 do 8.

DYSKUSJA WYNIKÓW

Szczepy mikroorganizmów posiadających zdolność do tworzenia egzo-enzymów biorą udział w roli początkowej i decydującej o stopniu procesów przerabiania odpadów. Ale nie wszystkie szczepy posiadają zdolność syntezy pełnego zestawu i ilości egzo-enzymów potrzebnych do rozkładania substancji organicznych w odpadach. Dlatego prowadzimy ocenę zdolności badanych szczepów na rozkładanie CMC, celulozy i skrobi według metody dyfuzyjno-promieniowania na szalkach Petriego [Williams 1983]. Po ocenie, wybieramy do badania tylko szczepy mikroorganizmów, które mają zdolności rozkładania CMC, celulozy i skrobi, a resztę zostawiamy. Określono czas wzrostu, morfologię i rozmiary kolonii. Prowadzono hodowlę na szalkach Petriego w temperaturze 28 °C w ciągu 5 dni. Według tabeli identyfikacji Bergeya [1994] wyniki w tabeli 3 wskazują się, że te szczepy należą do grupy szybko rosnącej, bo rosną przed 72 godziną hodowania. Według Rynk [1992] i Gray [1994], większość procesów kompostowania zachodzi w zakresie pH od 5,5 do 9, a optymalne pH dla procesu kompostowania z udziałem mikroorganizmów odbywało się w zakresie pH od 6,5 do 8). Wynika z tabeli 4, że trzy szczepy badane mają dobrą zdolność rozkładania substancji organicznej w pryzmach kompostów.

Szczepy mikroorganizmów, które mają dobrą zdolność przeżywania na wysokich stężeniach antybiotyków, będą mieć dobrą odporność w warunkach środowiskowych, mają dobrą zdolność konkurencji i stąd silnie rozwijają się w środowisku. W badaniu wybrano 3 szczepy, które mają te zdolności (szczepy: Pr.1, Grz.1 i Bk.1). Oceniano stopnie bezpieczeństwa, prowadzono na systemie BSAS w celu

wykorzystania szczepów bezpiecznych do produkcji substancji biologicznych: spośród wielu szczepów wybierane 3 szczepy (1 stopień bezpieczeństwa).

Badano efektywność trzech wybranych szczepów mikroorganizmów w kompostowaniu odpadów. Oceniano bezpieczeństwo stosowania szczepów, efektywność rozkładania oraz stosowanie metodą szeregowania kolejności ADNr 16S dla bakterii i promieniowców [Vandenbergh i Olsen 1987] oraz metodą opisu morfologii, rozmiary i porównywano z kluczem identyfikacji dla grzybów [Ainsworth i Bisby's 2001], stwierdzono że szczepy: *Streptomyces griseus*, *Aspergillus oryzae*, *Bacillus subtilis*, są bezpieczne w stosowaniu i możemy używać ich do produkcji substancji biologicznych w celu przerabiania odpadów.

WNIOSKI

- Trzy szczepy używane w badaniu są efektywne w rozkładzie CMC, celulozy i skrobi, posiadają aktywność w procesie tworzenia próchnicy (od 90-94% po 50 dni i 30 dni kompostowania prób kompostów).
- Mają wysoką zdolność przeżywania na substancję antybiotyczną (ampicylina od 300-1000 mg/litr).
- Trzy szczepy należą do grupy mikroorganizmów szybko-rosnących, bezpiecznych grupy 1, rosnących w szerokim zakresie pH od pH = 5 do pH = 9 i te szczepy możemy używać w produkcji roztworów biologicznych.

LITERATURA

1. AINSWORTH & BISBY'S: *Dictionary of the Fungi*. CABI Bioscience (CAB INTERNATIONAL), UK, Wydanie IX, s. 569-655, 2001
2. BCRC – Bioresource Collection and Research Center. <http://strain.bcrc.firdi.org.tw/BSAS/>, 2011
3. BERGEYA D.H., HOLT J.G.: *Manual of determinative Bacteriology* Bergey's Editor: William R. Hensy, Baltimore, Maryland 21202, USA. (Ninth Edition), 1994
4. BEYEA JAN, CHARTIE CANZON, STEVE DIDY: *Composting Yard and Municipal soild waste*, United States. Environmental Agency 1995
5. GRAY N.F, *Drinking Water Quality: problems and solutions*. John Wiley and Sons, Chichester, 315pp, 1994
6. KLIMIUK E., ŁEBKOWSKA M.: *Biotechnologia w ochronie środowiska*. Wyd. naukowa PWN Warszawa 2008
7. KRZYWY E, NOWAK W., WOŁOSZYK Cz.: *Chemia Rolna - Przewodnik do ćwiczeń*. AR w szczecinie, Szczecin 1997

8. NGUYEN THI BICH LOC: *Laboratorium biotechnologii dla kierunku Inżynierii Środowiska*, UZ, Zielona Góra 2009
9. NICKLIN J., GRAEME-COOK K., PAGET., KILINGTON R.: *Mikrobiologia – wykłady*, PWN, Warszawa 2004
10. NICHOLAS P. CHEREMISNOFF, Ph.D.: *Biotechnology for waste and wastewater treatment*. Noyes publications, Westwood, New Jersey, USA, 1-36, 57-96, 1996
11. NOWAK A., MARSKA B., WRONKOWSKA H., MICHALEWICZ W.: *Przewodnik do ćwiczeń z mikrobiologii dla kierunku rolniczego, ogrodniczego i ochrony środowiska*. Akademia Rolnicza w Szczecinie, Szczecin 1995
12. RODINA A.: *Mikrobiologiczne metody badania wód*. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa 1968
13. RYNK R.: *Composting: Webster's Quotations, Fact and Phrases*. Published by ICON Group International, Inc. San Diego, California 92121, USA, 91p, 1992
14. VANDENBERGH P.A.R.H., OLSEN J.H.: *Coloruoble Isolation and Genetic Characterization of Bacteria that Degrades Chloroaromatic Compounds*. JAPCA, Oct., pp.737-739, 1987
15. WILLIAMS T.M., UNZ R.F.: *Environmental distribution of Zoogloea strains*. *Wates Res.*, 17: 779-787, 1983

EFFECTIVENESS OF MICROORGANISMS IN THE COMPOSTING PROCESS OF WASTE FROM THE PROCESSING OF FRUITS AND VEGETABLES

S u m m a r y

*Waste from processing of fruits and vegetables were composted with sawdust in a ratio of 1:2. The process lasted 50 days for onions and garlic, 30 days for waste from other plants (fruits, vegetables, tubers). Batch inoculated with the following microorganisms: *Bacillus subtilis* (Bk1) *Streptomyces griseus* (pr.1), *Aspergillus oryzae* (Grz.1). Microorganisms selected for the inoculation showed the fastest growth (grew before 72 hours after cultivation) in the environment of varying pH (pH 5-9). Effectiveness of microorganisms in decomposition of CMC, cellulose and starch into humus ranged from 90 to 94%. Microorganisms showed a high resistance to antibiotics present in the compost (300-1000 mg/l). Composting of fruits and vegetable waste produces high quality fertilizer.*

Key words: waste, fruits, vegetables, compost, strains microorganism: *Bacillus subtilis*, *Streptomyces griseus*, *Aspergillus oryzae*