UNIWERSYTET TECHNOLOGICZNO-PRZYRODNICZY
IM. JANA I JĘDRZEJA ŚNIADECKICH
W BYDGOSZCZY

ROZPRAWY NR 165

Anna Ligocka

OPRACOWANIE MIKROBIOLOGICZNYCH METOD MONITOROWANIA PROCESÓW SANITYZACJI ODPADÓW MIĘSNYCH PRZEZNACZONYCH DO CELÓW ROLNICZYCH

BYDGOSZCZ – 2013

REDAKTOR NACZELNY
prof. dr hab. inż. Józef Flizikowski

REDAKTOR DZIAŁOWY
prof. dr hab. inż. Małgorzata Zalewska

OPINIODAWCY
prof. zw. dr hab. Hanna Dahm
dr hab. Adam Malicki, prof. nadzw. UP

OPRACOWANIE REDAKCYJNE I TECHNICZNE
mgr Michał Górecki, mgr inż. Tomasz Szałajda

© Copyright
Wydawnictwa Uczelniane Uniwersytetu Technologiczno-Przyrodniczego
Bydgoszcz 2013

Utwór w całości ani we fragmentach nie może być powielany
ani rozpowszechniany za pomocą urządzeń elektronicznych, mechanicznych,
kopiujących, nagrywających i innych bez pisemnej zgody
posiadacza praw autorskich.

ISBN 978-83-61314-59-2
ISSN 0209-0597

Wydawnictwa Uczelniane Uniwersytetu Technologiczno-Przyrodniczego
ul. Ks. A. Kordeckiego 20, 85-225 Bydgoszcz, tel. 52 3749482, 3749426
e-mail: wydawucz@utp.edu.pl http://www.wu.utp.edu.pl

Wyd. I. Nakład 104 egz. Ark. aut. 6,00. Ark. druk. 6,5. Zamówienie nr 7/2013
Oddano do druku i druk ukończono w maju 2013
Uczelniany Zakład Małej Poligrafii UTP Bydgoszcz, ul. Ks. A. Kordeckiego 20

Spis treści

1. WSTĘP 5
2. CEL BADAŃ 13
3. MATERIAŁY I METODY 14
   3.1. Technologie sanityzacyjne 14
      3.1.1. Kompostowanie 14
      3.1.2. Fermentacja beztlenowa odpadów 15
   3.2. Nośniki wykorzystane w badaniach 16
      3.2.1. Nośniki bakteriologiczne 17
         3.2.1.1. Nośniki mięsne 17
         3.2.1.2. Nośniki kostne 18
      3.2.2. Nośniki wirusologiczne 18
      3.2.3. Nośniki parazytologiczne 19
   3.3. Badania mikrobiologiczne i parazytologiczne 20
      3.3.1. Badania bakteriologiczne 20
         3.3.1.1. Oznaczanie ilościowe pałeczek *Escherichia coli* 20
         3.3.1.2. Oznaczanie ilościowe *Enterococcus faecalis* 20
         3.3.1.3. Oznaczanie ilościowe pałeczek *Salmonella* Senftenberg W_{775} 20
      3.3.2. Badania wirusologiczne 21
      3.3.3. Badania parazytologiczne 21
   3.4. Analiza statystyczna wyników 22
   3.5. Oznaczanie właściwości fizykochemicznych gleby, kompostu i cieczy pofermentacyjnej 22
      3.5.1. Badania gleby kontrolnej i gleb z dodatkiem kompostu i cieczy pofermentacyjnej 22
      3.5.2. Badania kompostu i cieczy pofermentacyjnej 23
   3.6. Badania mikrobiologiczne gleby 24
4. WYNIKI 25
   4.1. Kompostowanie 25
   4.2. Fermentacja w warunkach mezofilnych 50
   4.3. Fermentacja w warunkach termofilnych 56
   4.4. Badania mikrobiologiczne gleby 68
      4.4.1. Gleba z dodatkiem kompostu 68
      4.4.2. Gleba z dodatkiem cieczy pofermentacyjnej 73
   4.5. Skład chemiczny i właściwości fizyczne gleby kontrolnej i „polepszaczy” 78
5. DYSKUSJA 81
6. WNIOSKI 95

LITERATURA 97

STRESZCZENIA 105

1. WSTĘP

Produkty uboczne pochodzenia zwierzęcego powstają przede wszystkim przy uboju zwierząt przeznaczonych do spożycia przez ludzi, w trakcie produkcji wyrobów pochodzenia zwierzęcego, a także podczas usuwania zwierząt martwych. Odpady te stanowią potencjalne zagrożenie dla zdrowia ludzi i zwierząt oraz dla środowiska, a ich zagospodarowanie stanowi poważny problem ekologiczny we wszystkich państwach Unii Europejskiej. Odpady bogate w składniki organiczne o dużej wartości nawozowej mogą jednocześnie zawierać liczne drobnoustroje patogenne, głównie pochodzenia jelitowego oraz jaja pasożytów. Do najczęściej izolowanych z odpadów mięsnych drobnoustrojów należą bakterie z rodzaju *Salmonella*, *Escherichia*, *Clostridium*, paciorkowce kałowe, paciorkowce świńskie, parwowirusy i enterowirusy bydlęce, a także jaja pasożytów *Ascaris suum* [Ruitshauser i wsp. 1984, Biermann i wsp. 1989, Nørrung i wsp. 2009]. Poza odpadami poubojowymi mikroorganizmy chorobotwórcze i jaja pasożytów mogą być obecne również w ściekach poprodukcyjnych pochodzących z zakładów mięsnych i w ściekach komunalnych. Część epidemiologów twierdzi, że wyniki badań wód i osadów ściekowych odzwierciedlają sytuację epidemiologiczną na danym obszarze. Co więcej, uważa się, że od 0,5 do 5% populacji ludzi zakaża się przez ścieki [Budzińska i Jurek 2003]. W Rozporządzeniu (WE) nr 1774/2002 i nr 1069/2009 Parlament Europejski i Rada ustanowiły wspólnotowe przepisy sanitarne dotyczące produktów ubocznych pochodzenia zwierzęcego nieprzeznaczonych do spożycia przez ludzi. Podzielono je na trzy kategorie w zależności od potencjalnego zagrożenia poszczególnych odpadów dla zdrowia ludzi i zwierząt oraz środowiska naturalnego. Do kategorii 1. zaliczono odpady szczególnego ryzyka pochodzące od zwierząt podejrzanych głównie o możliwość zakażenia BSE (*Bovine Spongiform Encephalopathy* – gąbczasta encefalopatia bydła) lub innymi chorobami niebezpiecznymi dla ludzi. Kategoria 2. to odpady wysokiego ryzyka (m.in. odchody i treść przewodu pokarmowego, surowce zwierzęce gromadzone podczas oczyszczania ścieków z rzeźni, zwierzęta, które padły z przyczyn innych niż ubój, z przeznaczeniem do spożycia przez ludzi, włączając w to zwierzęta ubite w celu likwidacji epidemii choroby). Odpady niskiego ryzyka należą do kategorii 3. i są to głównie: części zwierząt po uboju nadające się do spożycia przez ludzi, ale nie przeznaczone do tego celu z przyczyn handlowych, części zwierząt odrzucone po uboju jako nie nadające się do spożycia przez ludzi, nienoszące znamion chorób przenoszonych na ludzi i zwierzęta, krew zwierząt innych niż przeżuwacze, skóry, kopyta, pióra, wełna, rogi, sierść pochodzące od zwierząt nie wykazujących klinicznych objawów choroby. Produkty kategorii 3. mogą być wykorzystane jako surowiec podlegający kompostowaniu lub fermentacji beztlenowej. Zastosowanie tych metod biotechnologicznych prowadzi do sanityzacji odpadów i pozwala na otrzymanie bezpiecznego produktu finalnego o dużych wartościach nawozowych dla rolnictwa.

Surowiec kategorii 3. wykorzystywany w kompostowni musi spełnić następujące wymagania:

a) maksymalna wielkość cząstek przed wprowadzeniem ich do reaktora – 12 mm,
b) minimalna temperatura całego surowca podczas obróbki w reaktorze – 70°C,
c) minimalny czas obróbki w reaktorze przy temperaturze 70°C – 60 minut.

W przypadku poddania go procesowi fermentacji w wytwórni biogazu wyposażonej w urządzenia do pasteryzacji musi podlegać następującym minimalnym wymaganiom:

a) maksymalna wielkość cząstek przed wprowadzeniem ich do urządzenia – 12 mm,
b) minimalna temperatura całego surowca podczas obróbki w urządzeniu – 70°C,
c) minimalny czas obróbki w urządzeniu – 60 minut.

Jednak możliwe jest stosowanie innych parametrów procesu kompostowania i fermentacji, o ile dowiedzie się, że zapewniają one minimalizację ryzyka biologicznego. Można do tego celu wykorzystać dobrze scharakteryzowany szczep testowy bakterii lub wirusa, wprowadzić go w odpowiedniej próbce testowej do materiału początkowego i monitorować jego inaktywację. Skuteczna sanityzacja nastąpi wtedy, gdy dojdzie do zmniejszenia liczby *Enterococcus faecalis* lub *Salmonella* Senftenberg W_{775} o 5 cykli log oraz do zmniejszenia zakaźności ciepłoopornych wirusów, takich jak parwowirusy, o co najmniej 3 cykle log [Rozporządzenie nr 1774/2002 i 1069/2009]. Produkt otrzymany w wyniku właściwej sanityzacji mógłby stać się „polepszaczem" gleb i stanowić alternatywę dla innych form nawożenia.

Spośród drobnoustrojów stosowanych do walidacji procesów sanityzacji odpadów organicznych, poza *Salmonella* Senftenberg W_{775} i *Enterococcus faecalis*, na uwagę zasługują *Escherichia coli*, jaja nicieni *Ascaris suum*, a także bydlęce parwowirusy (BPV) i wirusy choroby Aujeszky'ego. Bydlęcy parwowirus jest termooporny (przeżywa w temperaturze 56°C 1 godzinę). Jego właściwości zakaźne w warunkach naturalnych i rola w patogenezie chorób bydła nie zostały w pełni wyjaśnione. Wirus wydalany jest z kałem oraz wydzieliną z jamy nosowej [Larski 1982]. Wirus choroby Aujeszky'ego (chA) jest zaopatrzony w lipidową osłonkę, dlatego łatwo ulega inaktywacji pod wpływem czynników chemicznych. Występuje głównie u świń, wywołując objawy ze strony układu nerwowego i rozrodczego [Lipowski 1992, Lipowski i Pejsak 1996]. Znajdowany jest w odpadach poubojowych. Poza wirusami BPV najbardziej oporne na wysoką temperaturę (główny czynnik sanityzacyjny) są także enterokoki i *Salmonella* Senftenberg W_{775}. Dodatkową cechą *Salmonella* Senftenberg W_{775} jest wyjątkowa rzadkość występowania w odpadach mięsnych i łatwa identyfikacja przez naturalny marker (H_2S^-) [Böhm 2002]. Zakłada się, że jeżeli dojdzie do zniszczenia termoopornych szczepów, to z dużym prawdopodobieństwem zginą również inne mikroorganizmy, włączając patogeny. W badaniach skuteczności sanityzacyjnej danej technologii wykorzystuje się również pałeczki *Escherichia coli* ze względu na częstość występowania w odpadach i łatwość ich oznaczania. Pomimo niewielkiego ryzyka, jakie niesie

ze sobą ich obecność w środowisku, niektóre szczepy tego gatunku (ok. 1%) mogą stanowić zagrożenie dla zdrowia [Grant i wsp. 1996, Olson 2003]. Szczególnie niebezpieczne są szczepy enterokrwotoczne (EHEC) o serotypie O157. Wywołują one krwotoczne zapalenie okrężnicy oraz hemolityczny zespół mocznicowy [Glass i wsp. 1992]. Z kolei, enterokoki kałowe należące do serologicznej grupy Lancefield D są coraz częściej przyczyną trudnych do wyleczenia stanów zapalnych układu moczowego, zakażeń ran i bakteriemii u ludzi [Wade 1997, Stosor i wsp. 1998, Witte i wsp. 1999]. Poza tym, jeżeli dostaną się do gleby, mogą być przyczyną transmisji genów antybiotykooporności do bakterii autochtonicznych [Noble i wsp. 1992, Aarestrup 1995, Bates i wsp. 1995]. Wiele mikroorganizmów trafiających, np. wraz z odpadami do gleby może przeżyć w niej bardzo długi czas. Pałeczki z rodzaju *Salmonella* identyfikowano w tym środowisku nawet po 180 dniach. Stwierdzono też, że mogą rozwijać się na roślinach w postaci biofilmu, a w sprzyjających warunkach przedostać się w głąb profilu glebowego i skazić wody gruntowe [Strauch 1993, Paluszak i wsp. 2003, Lapidot i wsp. 2006]. Przeżywalność pałeczek *Escherichia coli* szczepu EHEC w odchodach bydlęcych także jest wysoka i – jak wynika z badań Wang i wsp. [1996] – wynosi: w temperaturze $5^{o}C$ – 63 dni, $22^{o}C$ – 49 dni i w $37^{o}C$ – 42 dni.

Ważnym zagrożeniem dla środowiska są także zawarte w odpadach pasożyty. W ściekach komunalnych stwierdza się występowanie jaj wielu gatunków nicieni, tasiemców oraz przywr. Badania parazytologiczne przeprowadzone w Europie wykazały znaczne ilości oocyst *Eimeria* spp. w kale bydła, świń i drobiu. Ponadto u bydła stwierdzono obecność jaj *Trichostrongylidae*, a u świń *Ascaris suum* [Strauch 1993]. Jaja *A. suum* przeżywają w glebie nawożonej ściekami do 10 lat, a w składowanych odpadach do 2 lat [Bergstrom i Langeland 1981]. Stwarzać to może poważne problemy epidemiologiczne zwłaszcza w krajach, gdzie osady ściekowe w rolnictwie wykorzystywane są na szeroką skalę. Szczególną rolę, ze względów sanitarnych, odgrywają również wirusy występujące w odpadach. W procesie oczyszczania ścieków komunalnych, przy dotychczas stosowanych technologiach, nie dochodzi do całkowitej ich eliminacji. Nawet w procesie produkcji biogazu w fazie mezofilnej zostaje zniszczona tylko część ich populacji. Wirusy, które wraz z nawozami organicznymi wprowadza się do środowiska, mogą być adsorbowane na cząstkach gleby, a następnie przenoszone w jej głębsze warstwy. Do zakażeń ludzi i zwierząt może dochodzić wskutek spożywania roślin z pól obficie nawożonych ściekami komunalnymi nie poddanymi procesom sanityzacyjnym, cieczą pofermentacyjną czy kompostem, który powstał w wyniku procesu ze zbyt krótką fazą termofilną [Lund i Ronne 1973, Lund i Nissen 1983, Monteith i Shannon 1986].

Usuwanie wszystkich produktów ubocznych pochodzenia zwierzęcego nie jest wykonalne, ponieważ wiązałoby się z wysokimi kosztami i stwarzałoby zagrożenie dla środowiska. Odpady rolnicze i z przemysłu rolno-spożywczego, w skład których wchodzą również odpady odzwierzęce zawierają większość składników odżywczych niezbędnych do rozwoju mikroorganizmów i dlatego

pozostawienie ich w stanie surowym mogłoby spowodować zagrożenie sanitarne oraz problemy środowiskowe (emisja gazów do atmosfery, eutrofizacja wód powierzchniowych i gruntowych). Z tego względu odpady powinno poddawać się degradacji metodami biotechnologicznymi, które pozwalają na przekształcenie ich w energię i cenne produkty, takie jak pasza czy nawozy [Ledakowicz i Krzystek 2005]. Skuteczność sanityzacyjna kompostowania i fermentacji beztlenowej zależy od wielu czynników. Poza temperaturą, która odgrywa najważniejszą rolę, ważna jest też: aktywność mikroorganizmów, wymiar cząstek odpadów, wilgotność, pH biomasy czy stosunek C:N. Kompostowanie przebiega najbardziej efektywnie, kiedy iloraz tych pierwiastków wynosi 25-35:1. Wartość temperatury biomasy i czas utrzymywania jej na wysokim poziomie ma wpływ na niszczenie mikroorganizmów chorobotwórczych, które mogą być obecne w substratach. Przyjmuje się, że w przypadku kompostowania w pryzmach wystarczająca dla sanityzacji masy jest temperatura 55^{o}C oddziałująca przez okres 2 tygodni [Strauch 1991]. Uważa się nawet, że utrzymywanie temperatury na poziomie 55-60^{o}C tylko przez dzień albo dwa powinno być wystarczające, aby zredukować poziom patogennych wirusów, bakterii, pierwotniaków (włączając cysty) i jaj pasożytów [Haug 1993]. Badania Schrammeka i Sauerwalda [1983] wskazują na konieczność napowietrzania pryzm kompostowych celem likwidacji stref beztlenowych, w których proces sanityzacji nie zachodzi. Zasadniczy podział technologii kompostowania uwzględnia jednocześnie sposób napowietrzania biomasy [Jędrczak i Haziak 2005]. Po pierwsze pryzmy mogą być napowietrzane naturalnie, a proces ten można wspomóc przez wprowadzenie perforowanych rur w celu lepszego przepływu powietrza. Wadą tego systemu jest powstawanie stref beztlenowych o niższej temperaturze, co powoduje powstawanie odorów wskutek niepełnego rozkładu substancji organicznej. Inna technologia obejmuje pryzmy przerzucane lub z napowietrzaniem wymuszonym – w metodzie tej stosowane są wentylatory, które wymuszają przepływ powietrza w perforowanych rurach. Dodatkowo praktykuje się przerzucanie zawartości pryzm. Niedoskonałością tej metody jest ochładzanie materii organicznej. I wreszcie bioreaktory, czyli instalacje zamknięte, w których przebieg procesu kompostowania jest dokładnie sterowany poprzez ustalanie wilgotności, temperatury i intensywności napowietrzania. Technologia ta znacznie podnosi efektywność kompostowania. Aktywna faza procesu może być skrócona z 3-5 tygodni do 10-14 dni. Właściwe napowietrzanie biomasy wpływa na przebieg temperatury w trakcie procesu. Jednokrotne przerzucanie pryzm kompostowych wg Straucha i wsp. [1980] powoduje, że wzrost temperatury jest wysoki 65-70^{o}C, natomiast proces odkażania następuje dopiero po okresie 7 tygodni. Wielokrotne przerzucanie pryzm gwarantuje ich lepsze napowietrzanie i powoduje, że temperatura biomasy może wzrosnąć do ponad 80^{o}C i dłużej się utrzymuje na wysokim poziomie niż w przypadku jednokrotnego przerzucania [Rubin 1996]. Z kolei bioreaktory zamknięte wyposażone są najczęściej w wentylację wymuszoną za pośrednictwem sprężarki, co sprzyja osiągnięciu przez biomasę temperatury bliskiej nawet 80^{o}C [Roediger 1985].

Jednak według Straucha i wsp. [1980] temperatura nie jest jedynym czynnikiem niszczącym patogeny w trakcie procesów sanityzacyjnych. Okazuje się, że konkurencja z innymi mikroorganizmami, antagonistyczne zależności między nimi, związki chemiczne powstające w trakcie rozkładu substancji organicznej, antybiotyki i inhibitory wzrostu również przyczyniają się do inaktywacji patogenów [Haug 1993]. Niemniej jednak, temperatura jest jedynym parametrem, który można łatwo mierzyć i kontrolować podczas kompostowania. Dlatego, to właśnie jej wartość często jest wskaźnikiem zniszczenia mikroorganizmów chorobotwórczych. Duże znaczenie w przebiegu procesu kompostowania ma też stopień rozdrobnienia surowca. Mniejsze rozmiary odpadów mają większą powierzchnię w porównaniu z ich objętością i w początkowej fazie kompostowania są łatwiej podatne na biodegradację. Mniejsze cząsteczki to również większa jednorodność mieszaniny i lepsza izolacja cieplna biomasy, pozwalająca utrzymywać wysoką temperaturę w jej wnętrzu. Z drugiej jednak strony, zbyt małe cząsteczki redukują objętość wolnych przestrzeni i tym samym dostępność tlenu. Wymiar cząstek, przy optymalnej ich wilgotności, powinien zapewniać objętość wolnych przestrzeni powietrznych w przedziale 25-35% [Bilitewski i wsp. 2003]. Niezależnie od metody kompostowania, prawidłowo przeprowadzony proces gwarantuje otrzymanie finalnego produktu wolnego od drobnoustrojów chorobotwórczych i bogatego w próchnicę oraz mikroelementy. Taki kompost może zatem być wykorzystany w rolnictwie do celów nawozowych.

Obok procesów kompostowania coraz większe znaczenie odgrywa w Europie beztlenowa fermentacja odpadów organicznych. Poza redukcją objętości odpadów technologia ta pozwala uzyskać także energię. Jest to proces zamknięty, następuje w nim redukcja odorów, inhibicja większości patogenów, a ponadto w jego efekcie otrzymuje się produkt pofermentacyjny mogący służyć do kondycjonowania gleb. W praktyce stosuje się najczęściej kofermentację, czyli fermentację mieszaniny dwóch lub więcej substratów. Jest to proces bardziej korzystny niż fermentacja pojedynczych składników. W wyniku kofermentacji uzyskuje się większy stopień rozkładu substancji organicznej oraz większą produkcję biogazu. Wadą jest konieczność dodatkowego przygotowania odpadów, higienizacja wsadu (np. odpadów poubojowych) czy większe zapotrzebowanie na energię do mieszania biomasy [Kopeć i Gondek 2011]. O prawidłowym przebiegu fermentacji decyduje, poza substratem, wiele czynników, m.in. mikroorganizmy, pH, wymiar cząstek, temperatura, zawartość składników pokarmowych i toksycznych. Populacje bakterii aktywnych w poszczególnych etapach fermentacji wymagają odpowiednich proporcji między azotem, fosforem, siarką a węglem. Za prawidłowy skład wsadu uznaje się taki, w którym iloraz C:N wynosi od 10-25:1, a iloraz N:P:S ma się tak, jak 7:1:1. Z kolei, na skuteczność sanityzacyjną fermentacji wpływają temperatura, czas, stopień skażenia biomasy oraz rodzaj patogenów [Metzler i Pesaro 1993]. W przypadku fermentacji odpadów organicznych najczęściej wykorzystywany jest zakres mezofilny temperatur, ponieważ pomiędzy 30 a 40^{o}C aktywność biocenozy jest względnie stała, a spektrum gatunkowe bakterii mezofilnych szerokie, co pozwala na kom-

pleksowy rozkład substratów. Warunki mezofilne nie pozwalają jednak na pełną sanityzację fermentowanego materiału. Większą rolę w tego typu procesach odgrywa aktywność antagonistyczna i biochemiczna mikroorganizmów niż temperatura [Bendixen 1997]. Wykazano np., że w trakcie fermentacji w warunkach mezofilnych, a nawet psychrofilnych redukcji może ulegać od 97 do 100% form wegetatywnych bakterii, a powstający w czasie procesu amoniak inaktywuje bardzo silnie picornawirusy i rotawirusy [Ward i Ashley 1977, Deng i Cliver 1995, Cote i wsp. 2005]. Mniej wrażliwe na warunki fermentacji w warunkach mezofilnych są jaja helmintów czy *Entameba*, a termostabilne wirusy inaktywowane są dopiero w temperaturze 54-56^{o}C [Bendixen 1997, Turner i wsp. 1999]. Wysoką sanityzację fermentowanego materiału zapewnia więc prowadzenie procesu w termofilnym zakresie temperatur (55-57^{o}C), w którym systemy enzymatyczne mikroorganizmów ulegają nieodwracalnemu uszkodzeniu. Podwyższona temperatura jest czynnikiem dominującym w trakcie inaktywacji bakterii i wirusów w procesie termofilnym [Lund i wsp. 1996].

Zarówno kompostowanie, jak i fermentacja należą do procesów biologicznego przetwarzania odpadów, które zaliczane są do metod R3. Obejmują one recykling lub regenerację substancji organicznych, których głównym celem jest wytworzenie kompostu lub przefermentowanego produktu, które nie będą już odpadami, jeżeli spełnią kryteria jakościowe dla nawozów organicznych lub środków wspomagających uprawę roślin [Ustawa o odpadach 2001]. Kryteria te uwzględniają:

a) określoną dopuszczalną zawartość metali ciężkich (Cr – 100 mg, Cd – 5 mg, Ni – 60 mg, Pb – 140 mg, Hg – 2 mg w przeliczeniu na 1 kg s.m. nawozu lub „polepszacza"),
b) parametry mikrobiologiczne (brak bakterii z rodzaju *Salmonella*, a bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* mniej niż 1000 jtk w 1 g nawozu),
c) parametry parazytologiczne (brak żywych jaj pasożytów jelitowych z rodzaju *Ascaris*, *Trichuris* i *Toxocara*),
d) parametry chemiczne (20-30% substancji organicznej, 0,08-1% azotu całkowitego, 0,05-0,5% fosforu w przeliczeniu na P_2O_5, 0,012-1% potasu w przeliczeniu na K_2O).

Jeżeli jakość produktów recyklingu biologicznego R3 odpowiada wymaganiom dla nawozów lub „polepszaczy", produkty mogą być odzyskiwane metodą R10, czyli rozprowadzone na powierzchni ziemi w celu nawożenia lub ulepszenia gleby. W przeciwnym przypadku klasyfikuje się je jako odpady i określa mianem stabilizatów. Przy kwalifikowaniu odpadów do rozprowadzania ich na powierzchni ziemi w celu nawożenia lub ulepszania gleb uwzględniono dwa kryteria. Są to przydatność odpadów do takich czynności (w szczególności dostarczanie roślinom składników pokarmowych oraz istotny wpływ na wzrost plonu i cechy użytkowe roślin), a także brak szkodliwego oddziaływania odpadów na zdrowie ludzi i zwierząt oraz na środowisko. Gleba jest bardzo dobrym układem umożliwiającym wykorzystanie odpadów. Stają się one

substratem dla mikroorganizmów i mikrofauny glebowej. Mikrobiologiczne procesy rozkładu substancji organicznej prowadzą do powstania mineralnych form makro- i mikroelementów będących składnikami pokarmowymi roślin. Z drugiej strony zachodzą procesy humifikacji, prowadzące do powstania związków organicznych tworzących glebową próchnicę. Wprowadzenie do gleby masy odpadowej wpływa zatem na polepszenie żyzności środowiska glebowego.

Regulacje prawne związane z nieprzemysłowym wykorzystaniem produktów finalnych procesu kompostowania czy fermentacji odpadów odzwierzęcych określa Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi Nr 1767 [2003]. Według tego dokumentu mogą one być uznane za „polepszacze" gleby. Mianem tym określa się materiały pochodzenia zwierzęcego wykorzystywane do poprawienia odżywiania roślin oraz fizycznych i chemicznych właściwości gleb, a także aktywności biologicznej tych gleb, stosowane razem lub osobno, w tym również odchody, treści przewodu pokarmowego, kompost i pozostałości po produkcji biogazu. Nawozowe użytkowanie „polepszaczy" ma zapewnić zachowanie próchniczności gleby z możliwością jej poprawy. Istotne jest również dostarczenie materii organicznej, która podnosi żyzność gleb. Kompost wprowadzony do gleby poprawia jej właściwości fizyczne, chemiczne i biologiczne, co znajduje odzwierciedlenie w poprawie struktury gleby, zdolności zatrzymywania wody, odporności na erozję, zwiększaniu zawartości makro- i mikroelementów. Dochodzi również do stymulacji rozwoju mikroorganizmów glebowych i ułatwionego rozwoju systemu korzeniowego roślin [Jędrczak 2007]. Mikroorganizmy trafiające wraz z kompostem do gleby hamują również rozwój drobnoustrojów chorobotwórczych dla roślin. Podstawowymi mechanizmami tego procesu wydają się być: współzawodnictwo o niszę ekologiczną i substancje odżywcze, produkcja antybiotyków czy zjawisko nadpasożytnictwa związane z produkcją enzymów niszczących mikroorganizmy (np. chitynaz) [Hoitink i wsp. 1991]. Udowodniono również, że dodatek kompostu do gleby powoduje wystąpienie u roślin nabytej lub indukowanej odporności systemicznej na zakażenie bakteryjnymi lub grzybowymi fitopatogenami (SAR, ISR) [Zhang i wsp. 1996]. Nawóz ten stymuluje również silny wzrost fauny glebowej, co wpływa na lepsze przewietrzanie gleby, szybszy przebieg procesu mineralizacji materii organicznej, a tym samym poprawę żyzności gleby. Avnimelech i wsp. [1993] stwierdzili, że nawożenie gleb o niskiej żyzności kompostem z bioodpadów powoduje przyrost plonowania pszenicy o 10-20% w porównaniu z samym tylko nawożeniem mineralnym.

W trakcie procesów beztlenowych, którym poddawane są odpady z surowca usuwana jest część węgla, wodoru i tlenu, jednak podstawowe składniki odżywcze (N, P, K) w większości pozostają w materiale przefermentowanym, co więcej, podczas fermentacji organiczne związki azotu ulegają przekształceniu w łatwo przyswajalny dla roślin azot amonowy. Brak strat substancji nawozowych pozytywnie odróżnia proces fermentacji od kompostowania, w którym to straty azotu mogą sięgać nawet 30% [Jędrczak 2007]. Stosując „polepszacze"

do celów nawozowych nie powinno się wprowadzać do gleby nadmiernych ilości azotu dostępnego dla roślin. Roczna dawka tego pierwiastka wprowadzana na 1 ha użytków rolnych nie może przekraczać 170 kg, poza tym nawożenie takie można stosować raz na 3 lub 4 lata [Ustawa o nawozach i nawożeniu z dnia 10 lipca 2007 r].

Ocena żyzności gleby nie może opierać się tylko na podstawie właściwości fizykochemicznych czy zasobności w składniki pokarmowe. Ogromną rolę odgrywają w tym przypadku również autochtoniczne mikroorganizmy glebowe i mikroorganizmy zymogenne okresowo wprowadzane do gleby, np. wraz z „polepszaczami". Intensywność procesów biochemicznych katalizowanych przez obie populacje określa się mianem aktywności biologicznej gleby. Zależy ona m.in. od stosowania nawozów organicznych, które powodują zwiększenie zawartości węgla organicznego. Systematyczne nawożenie organiczne sprzyja rozwojowi bakterii, natomiast nawożenie mineralne zakwasza glebę i stymuluje rozwój grzybów [Myśków i wsp. 1996]. Pomiędzy stopniem rozwoju bakterii i promieniowców a grzybami istnieją ścisłe zależności – wzrostowi populacji bakterii i promieniowców odpowiada słabszy rozwój grzybów i odwrotnie. Zależność tę określa się mianem współczynnika fitosanitarnego i przedstawia jako iloraz sumy liczby bakterii i promieniowców do liczby grzybów. Większe wartości wskaźnika świadczą o słabszym rozwoju grzybów, natomiast mniejsze o ich silniejszym rozwoju. Silny rozwój grzybów jest zjawiskiem niekorzystnym, gdyż wiele ich gatunków ma właściwości toksyno twórcze [Myśków 1981].

Wykorzystanie procesów biologicznego przetwarzania odpadów jest w Polsce mało rozpowszechnione. W 2005 r. ponad 95,0% odpadów komunalnych podlegało składowaniu, a tylko 2,8% (255 tys. Mg) kompostowano. Udział fermentacji oszacowano na 0,7% (63 tys. Mg) [Rocznik statystyczny, 2006]. Metody biologiczne są ze wszech miar korzystne dla środowiska i podlegać mogą szczegółowej walidacji, dlatego powinny znaleźć znacznie szersze zastosowanie.

2. CEL BADAŃ

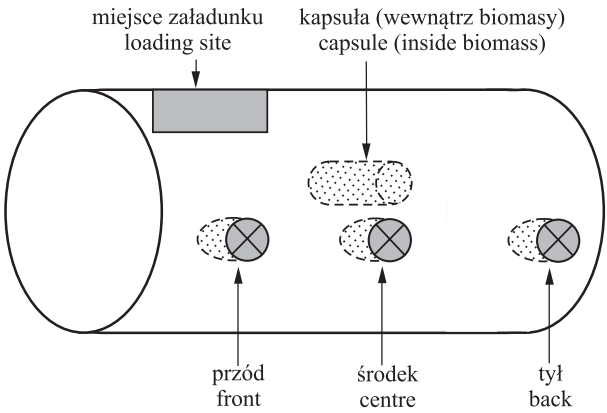
1. Ocena skuteczności sanityzacyjnej trzech biotechnologicznych metod przetwarzania niejadalnych odpadów mięsnych 3. kategorii, tj. kompostowania, fermentacji w warunkach termofilnych i mezofilnych na podstawie tempa inaktywacji wybranych mikroorganizmów i jaj pasożytów wprowadzonych do odpadów.
2. Ocena przydatności specjalnie skonstruowanych nośników odpadów poubojowych w monitorowaniu liczby mikroorganizmów, miana wirusów i przeżywalności jaj pasożytów w trakcie trwania procesów sanityzacyjnych.
3. Zaproponowanie nowego sposobu oceny skuteczności sanityzacyjnej wybranych technologii opierającego się na wprowadzaniu ekstremalnie skażonych nośników i kilkakrotnej ich analizie w trakcie trwania procesów.
4. Określenie niezbędnych warunków procesów kompostowania i fermentacji odpadów mięsnych, takich jak temperatura, czas trwania procesów i stopień rozdrobnienia odpadów dla uzyskania produktu finalnego bezpiecznego dla środowiska.
5. Wykazanie, że wymagania zawarte w Rozporządzeniu nr 1774/2002 i 1069/2009 Parlamentu Europejskiego wydają się być zbyt restrykcyjne w odniesieniu do wielkości cząstek odpadów mięsnych poddawanych wybranym procesom sanityzacyjnym.
6. Ocena wpływu uzyskanych, w wyniku kompostowania i fermentacji, produktów („polepszaczy") na wybrane właściwości fizykochemiczne i biologiczne gleby.

3. MATERIAŁY I METODY

3.1. TECHNOLOGIE SANITYZACYJNE

3.1.1. Kompostowanie

W badaniach wykorzystano bioreaktor bębnowy – komposter firmy Masstech działający w technologii ECOPRO. Składał się on z obrotowego bębna, zaopatrzonego z jednej strony w ślimakowy podajnik służący do załadunku odpadów, z drugiej mieściły się zasuwy umożliwiające rozładunek produktu finalnego. Urządzenie wyposażone było w czujniki zawartości tlenu, dwutlenku węgla oraz wilgotności, które pozwalały na pełną kontrolę i automatyzację procesu. Obroty bębna, temperatura oraz waga wsadu i uzyskanego produktu były stale monitorowane i dokumentowane. Biomasa była napowietrzana w sposób ciągły z wykorzystaniem sprężarki. Działanie kompostera było oparte na codziennym dostarczaniu porcji odpadów przy jednoczesnym opróżnianiu przekompostowanej biomasy. Z produktu finalnego formowano pryzmę, w której biomasa ulegała schładzaniu i dojrzewaniu przez co najmniej 2 tygodnie. Przed wprowadzeniem do kompostera odpady poubojowe były rozdrabniane i mieszane z materiałem strukturotwórczym. Odpady mięsne 3. kategorii (treści żołądków, skrawki, tłuszcze, krew) stanowiły 60%, a trociny – 40% biomasy. Nośniki bakteriologiczne, wirusologiczne i parazytologiczne umieszczano w trzech wnękach z przodu, pośrodku i z tyłu urządzenia, oraz w biomasie wewnątrz kompostera, w specjalnej kapsule (rys. 1, fot. 1). Wnęki kompostera i ściany kapsuły były perforowane, co umożliwiło nośnikom kontakt z kompostowanym materiałem. Temperatura biomasy w trakcie trwania procesów kompostowania monitorowana była w trzech miejscach urządzenia (przód, środek i tył) znajdujących się w pobliżu wnęk, do których wprowadzano nośniki. W pracy przeanalizowano sześć cykli kompostowania, które trwały od 84 do 210 godzin.



Rys. 1. Schemat kompostera
Fig. 1. The composter scheme

Fot. 1. Kapsuła wprowadzana do biomasy kompostera
Phot. 1. Capsule introduced to the composter biomass

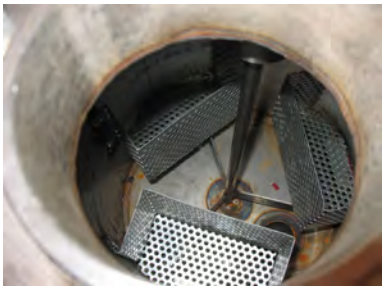
3.1.2. Fermentacja beztlenowa odpadów

Odpady wraz z nośnikami poddawane były sanityzacji w dwóch technologiach – fermentacji w warunkach mezofilnych w temperaturze 37°C, którą przeprowadzono w biogazowni rolniczej oraz w warunkach termofilnych w temperaturze 55°C w skali półtechnicznej w minireaktorze. W biogazowni zachodziła kofermentacja gnojowicy (29 000 ton·rok^{-1}) z kiszonką kukurydzianą (5 500 ton·rok^{-1}), odpadami poubojowymi (3 000 ton·rok^{-1}) i gliceryną (1 000 ton·rok^{-1}). Odpady z zakładów mięsnych poddawane były wcześniej procesowi obróbki termicznej w 70°C w higienizatorze. Nośniki umieszczano w specjalnie do tego celu przygotowanej perforowanej rurze, w której znajdowało się pięć komór (fot. 2). Rura była złożona z dwóch 1,5 metrowych członów połączonych gwintem, a następnie wprowadzana do otworu wpustowego, znajdującego się w górnej części reaktora. Sztywna konstrukcja osłaniająca zapewniła ochronę próbek, nie stanowiąc bariery dla oddziaływania warunków panujących w bioreaktorze. Wszystkie komory były całkowicie zanurzone w gnojowicy wypełniającej reaktor biogazowni.

Minireaktor składał się z komory fermentacyjnej zaopatrzonej w mieszadło mechaniczne. Całość otoczona była płaszczem grzejnym. Wewnątrz zbiornika znajdowały się trzy kosze umocowane na stałe, które służyły do umieszczenia w nich nośników (fot. 3). Biomasa poddawana fermentowaniu w tych warunkach pochodziła z reaktora biogazowni. Badania objęły dwa cykle badawcze w biogazowi rolniczej w warunkach mezofilnych i trzy – w minireaktorze w warunkach termofilnych.

Fot. 2. Perforowana rura, w której umieszczano nośniki, a następnie całość wprowadzano do biomasy reaktora biogazowi rolniczej (fermentacja w warunkach mezofilnych)

Phot. 2. Perforating pipe where carriers were placed and then they were introduced together to the biomass of reactor of the agricultural biogas plant (fermentation under mesophylic conditions)

A) B) 

Fot. 3. Minireaktory, w których zachodziła fermentacja w warunkach termofilnych (A) oraz wnętrze urządzenia z koszykami na nośniki (B)

Phot. 3. Minireactors where fermentation occurred under thermophylic conditions (A) and the inside of the device with baskets for carriers (B)

3.2. NOŚNIKI WYKORZYSTANE W BADANIACH

Przygotowano pięć różnych typów nośników odpadów odzwierzęcych [a-e], do których wprowadzono zawiesinę badanych bakterii i wirusów zaadsorbowanych na filtrach. Kolejne trzy [f-h] przeznaczono dla wirusów i jaj *Ascaris suum*. Wszystkie te nośniki wprowadzano do trzech różnych urządzeń, w których biomasa poddawana była kompostowaniu oraz fermentacji w warunkach mezofilnych i termofilnych.

Wykorzystano następujące nośniki:

a) mięso mielone,
b) mały nośnik mięsny w formie sześcianu o boku 3 cm,
c) duży nośnik mięsny w formie sześcianu o boku 5 cm,

d) główka kości udowej wieprzowej,
e) trzon kości udowej wieprzowej,
f) zawiesina wirusów w probówkach eppendoffa,
g) wirusy zaadsorbowane na filtrach,
h) jaja pasożytów *Ascaris suum* w woreczkach perlonowych.

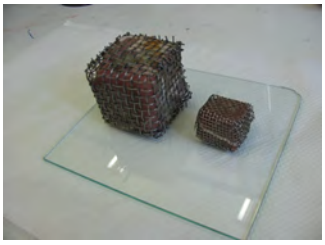
Nośniki imitujące odpady odzwierzęce [b-e] były opracowaniem własnym.

3.2.1. Nośniki bakteriologiczne

Zawiesina bakteryjna wprowadzana do nośników mięsnych i kostnych uzyskiwana była w wyniku 18-godzinnej hodowli *Escherichia coli*, *Salmonella* Senftenberg W_{775} i *Enterococcus faecalis* w bulionie odżywczym (Merck, 7882).

3.2.1.1. Nośniki mięsne

Fragmenty mięsa w postaci sześcianów umieszczano w drucianej siatce dla uniknięcia odkształcenia w trakcie trwania procesów sanityzacyjnych (fot. 4A).

A)  B)

Fot. 4. Duży i mały nośnik mięsny (A) oraz nośnik typu filter sandwich z mięsem mielonym (B)
Phot. 4. Big and small meat carrier (A) and filter sandwich type carrier with minced meat (B)

Trzeci typ nośnika mięsnego przygotowano wg projektu Rapp [1995] (fot. 4B). Mięso mielone wprowadzano do plastikowych rurek zaopatrzonych przy podstawach w membrany o wielkości porów 0,2 μm. Uniemożliwiały one przemieszczanie mikroorganizmów poza wnętrze nośnika i jednocześnie zapewniały oddziaływanie czynników fizykochemicznych na mikroorganizmy. Membrany zabezpieczono przed mechanicznymi uszkodzeniami specjalnymi plastikowymi krążkami. Do każdej z kostek mięsnych oraz do mięsa mielonego, przed ich wprowadzeniem w biomasę kompostera czy fermentora, wstrzykiwano zawiesinę badanych bakterii. Nośniki poddawane były analizom w określonych odstępach czasowych. Po zmieleniu kostek mięsnych 1-gramowe naważki poddawano badaniom mikrobiologicznym. W czasie „zerowym" określano liczbę mikroorganizmów przed wprowadzeniem ich do urządzeń.

3.2.1.2. Nośniki kostne

Nośniki przygotowano z trzonów i główek kości udowych wieprzowych, które zabezpieczono specjalnymi zamknięciami (fot. 5A, B). W celu łatwiejszego odzyskania wprowadzonych bakterii, zawiesinę zamykano w poliwęglanowych woreczkach o średnicy porów 0,015 µm (Infiltec GmbH, Polycarbonatmembran, Typ: PC-KN1CP81030). W ten sposób zapewniono również kontakt mikroorganizmów ze środowiskiem (fot. 6).

A) B)

Fot. 5. Nośniki kostne z główki (A) i trzonu (B) kości udowej
Phot. 5. Bone carriers made of femoral head (A) and femoral shaft (B)

Fot. 6. Wprowadzanie zawiesiny bakterii w woreczku do nośnika kostnego
Phot. 6. Introduction of bacterial suspension closed in bag into the bone carrier

3.2.2. Nośniki wirusologiczne

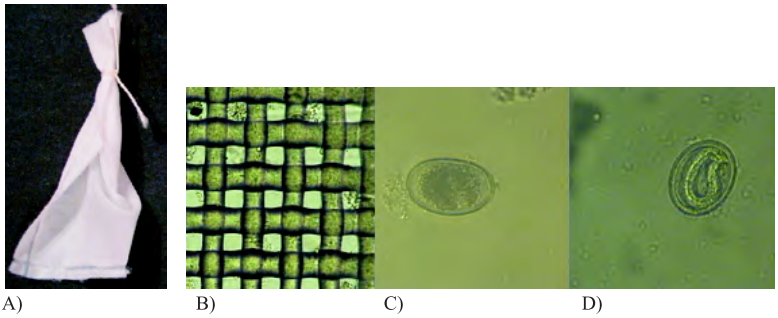
Sposób wprowadzania wirusów na nośnik oparto na zasadzie filter sandwich [Traub i wsp. 1986, Spillmann i wsp. 1987]. Na nylonową membranę Zetapor (Cuno Inc., Meriden, Conn., U.S.A., 64085-01-1 MDS) o grubości 500 µm i średnicy porów 0,45 µm nanoszono za pomocą strzykawki poprzez uszczelniony filtr plastikowy 1 ml zawiesiny parwowirusów lub wirusów choroby Aujeszky'ego o mianie – odpowiednio 5,8 log $TCID_{50}\cdot ml^{-1}$ i 3,55 log $TCID_{50}\cdot ml^{-1}$ w buforze fosforanowym o pH 6,5 (TCID − *Tissue Culture Infectious Dosis*). Membrany wkładano do poliwęglanowych woreczków o średnicy porów 0,015 µm (Infiltec GmbH, Polycarbonatmembran, Typ: PC-KN1CP81030), które uniemożliwiały przenikanie cząstek wirusa poza nośnik (fot. 7). Umiesz-

czano je następnie wewnątrz nośników mięsnych lub kostnych, wkładano do biomasy urządzeń i wyciągano w określonych odcinkach czasu. Następnie oznaczano miano wirusów, które nie uległy inaktywacji w czasie procesu kompostowania i fermentacji. Badaniom wirusologicznymi poddawano również zawiesinę znajdującą się w probówkach eppendorfa.

Fot. 7. Nośnik wirusologiczny
Phot. 7. Virusological carrier

3.2.3. Nośniki parazytologiczne

Jaja *Ascaris suum* uzyskiwano od dojrzałych płciowo osobników żeńskich. Preparowano macice i pobierano do badań ich fragmenty o długości około 2 cm od rozwidlenia w celu uniknięcia obecności w nich jaj niezapłodnionych. Jaja wyciskano bagietką do płytki Petriego wypełnionej płynem fizjologicznym, uzyskując zawiesinę o liczbie jaj od 1 x 10^3 do 6 x 10^3 w 1 ml. Zawiesinę w ilości 1 ml wprowadzano następnie do perlonowych woreczków mających pory o średnicy 28 μm [Rückert 1991]. Materiał perlonowy umożliwiał kontakt jaj z czynnikami zewnętrznymi i jednocześnie zapobiegał wydostawaniu się ich poza nośnik (fot. 8).



A) B) C) D)

Fot. 8. Nośnik parazytologiczny: A) perlonowy woreczek z jajami pasożytów, B) perlon w powiększeniu 300x, C) martwe jajo *Ascaris suum*, D) żywe jajo *A. suum* w powiększeniu 300x

Phot. 8. Parasitological carrier: A) perlon bag with parasite eggs, B) perlon material with magnification 300x, C) dead egg of *Ascaris suum*, D) living egg of *A. sum* with magnification 300x

3.3. BADANIA MIKROBIOLOGICZNE I PARAZYTOLOGICZNE

3.3.1. Badania bakteriologiczne

Każdorazowo do badań pobierano 1-gramowe (nośniki mięsne) lub 1-mililitrowe (nośniki kostne) próbki pochodzące z poszczególnych technologii utylizacyjnych. Na pierwszym etapie przygotowywano 10-krotny szereg rozcieńczeń w 0,85% NaCl w zakresie 10^{-1}-10^{-11}. Następnie, każdy z gatunków bakterii zaszczepiano na odpowiednią pożywkę płynną, a po inkubacji zawiesinę przenoszono na selektywne podłoża stałe. Liczbę drobnoustrojów określano metodą NPL i wyrażano w $NPL \cdot g^{-1}$ (nośniki mięsne) lub $NPL \cdot ml^{-1}$ (nośniki kostne) [Downes i Ito 2001].

3.3.1.1. Oznaczenie ilościowe pałeczek *Escherichia coli* [Hoferer 2001]

Próbki materiału dodawano do podłoża płynnego Mc Conkeya (Merck, 5396) i inkubowano w 43°C przez 24 godz. Następnie materiał przesiewano na agar z tergitolem z dodatkiem 1% roztworu 2,3,5-TTC (Merck, 7680) i inkubowano jw. O dodatnim wyniku badania świadczyła zmiana zabarwienia podłoża z koloru zielonego na żółty i wzrost drobnych żółtych kolonii. W przypadkach wątpliwych materiał przenoszono na agar odżywczy (Merck, 7881) celem uzyskania kolonii (inkubacja w 37°C przez 24 godz.), które poddawano testom wchodzącym w skład szeregu biochemicznego IMViC (*indole*, *methyl red*, *Voges-Proskauer*, *citrate*), wykorzystywano również test API 20E (Biomerieux, 20100/ 20160).

3.3.1.2. Oznaczenie ilościowe *Enterococcus faecalis* [Hoferer 2001]

Jako podłoża płynnego dla selektywnego wzrostu paciorkowców kałowych użyto bulion z glukozą i azydkiem (Merck, 1590). Po 48 godzinach inkubacji w 37°C z próbek pozytywnych (zmętnienie pożywki) przenoszono materiał na podłoże stałe – agar z kanamycyną, eskuliną i azydkiem (Merck, 5222) i inkubowano go w 37°C przez 48 godzin. Końcowa identyfikacja bakterii polegała na zastosowaniu wobec wyhodowanych czystych kultur testu serologicznego (Phadebac Strep D Test, Boule Diagnostics AB, Huddinge, Sweden).

3.3.1.3. Oznaczanie ilościowe pałeczek *Salmonella* Senftenberg W_{775} [Hoferer 2001, Polska Norma EN ISO 6579:2002/A1:2007]

W pierwszej fazie oznaczeń naważki umieszczano w 1% zbuforowanej wodzie peptonowej (Merck, 7228) i inkubowano w 37°C przez 24 godziny. Następnie przenoszono po 0,1 ml zawiesiny do probówek zawierających 10 ml selektywnie namnażającego podłoża płynnego wg Rappaporta (Merck, 10236). Inkubację prowadzono w 43°C przez 24-48 godzin. Po tym czasie materiał przesiewano na selektywne podłoże agarowe BPLA wg Kaufmanna (Merck,

7236) i inkubowano w 37°C przez 24 godziny. Końcowa identyfikacja polegała na zastosowaniu testów serologicznych – surowicy poliwalentnej HM.

3.3.2. Badania wirusologiczne [Hoferer 2001, Kasza i wsp. 1972]

Wirusy odzyskiwano z nośników membranowych w wyniku działania ultradźwięków, a ich miano oznaczano z wykorzystaniem linii komórkowych BEL (*Bovine Embryonic Lung*) dla parwowirusów oraz SK-6 (*Swine Kidney*) dla wirusów choroby Aujeszky'ego. Badania wykonano metodą mikropłytkową. Do namnażania komórek używano płynu Eagle'a z dodatkiem 7% cielęcej surowicy płodowej oraz antybiotyków (100 j.m.·ml^{-1} penicyliny krystalicznej, 100 µg·ml^{-1} streptomycyny i 50 µg·ml^{-1} gentamycyny). Zawiesiny wirusów rozcieńczano w wymienionym płynie w postępie logarytmicznym od 10^{-1} do 10^{-8}. W celu oznaczenia miana poszczególnych próbek do 4 studzienek w mikropłytkach wprowadzano po 50 µl odpowiednio rozcieńczonej zawiesiny wirusów, po 50 µl płynu utrzymującego (bez dodatku surowicy) oraz po 100 µl zawiesiny komórek w płynie wzrostowym. Kontrolę stanowiły niezakażone komórki odpowiedniej linii (100 µl) zawieszone w samym płynie Eagle'a (100 µl). Inkubację prowadzono w atmosferze 5% CO_2 w 37^{o}C. Zakażone hodowle komórkowe oglądano po 4 i 5 dniach w świetlnym mikroskopie odwróconym (pow. 50-100x). Wirus choroby Aujeszky'ego w hodowli linii ciągłej komórek nerki świni SK-6 wywoływał typowy dla herpeswirusów efekt cytopatyczny (CPE – *cytopathic effect*). Powstawały zaokrąglone komórki, które pojedynczo odrywały się od podłoża. Tworzyły się również komórki olbrzymie (syncytia komórkowe), które oddzielały się od warstwy niezakażonych komórek tworząc tzw. "okna". Parwowirus prowadził do zaokrąglenia i lizy zakażonych komórek. Miano poszczególnych próbek oznaczano metodą Kärbera [1931] i przedstawiano jako $\log_{10}$ TCID$_{50}$·ml^{-1}. Analogiczna procedura (poza zastosowaniem ultradźwięków) wykorzystana została dla wirusów w postaci zawiesiny wprowadzonej do probówek eppendorfa. Wyniki zweryfikowano i poddano analizie statystycznej.

3.3.3. Badania parazytologiczne [Rückert 1991]

Nośniki zawierające jaja *Ascaris suum* pobierano z biomasy urządzeń w odstępach kilkugodzinnych lub kilkudniowych (w zależności od warunków termicznych procesu), co umożliwiało prześledzenie tempa ich inaktywacji w biomasie. Woreczki rozcinano i układano wewnętrzną stroną w jałowych szalkach Petriego. Nośniki zalewano wodą i inkubowano przez 30 dni w temperaturze 28^{o}C. Jaja oglądano z użyciem mikroskopu optycznego (pow. 300x), po czym liczono jaja zawierające żywe larwy. Odsetek jaj aktywnych określono przez porównanie z próbą kontrolną (przechowywaną w temperaturze 4^{o}C). Wyniki badań obejmują średnie z trzech powtórzeń.

3.4. ANALIZA STATYSTYCZNA WYNIKÓW

Wyniki charakteryzujące liczebność mikroorganizmów, miano wirusów czy przeżywalność jaj pasożytów poddano analizie statystycznej z wykorzystaniem programu Statistica. Na podstawie prostych regresji wyliczono teoretyczny czas potrzebny do inaktywacji drobnoustrojów. Wykorzystano wzór:

$$y = ax + b$$

gdzie:

- y – log liczby bakterii/miana wirusów/odsetka żywych jaj pasożytów,
- a – współczynnik kierunkowy odpowiadający zmianie liczby bakterii/ miana wirusów/odsetka żywych jaj pasożytów w postaci log w czasie,
- x – czas,
- b – wyraz wolny odpowiadający log liczby bakterii/miana wirusów/odsetka inwazyjnych jaj pasożytów w czasie 0 zaangażowanych w dany proces.

3.5. OZNACZANIE WŁAŚCIWOŚCI FIZYKOCHEMICZNYCH GLEBY, KOMPOSTU I CIECZY POFERMENTACYJNEJ

Do badań wykorzystano glebę płową ze stacji badawczej w Mochełku, którą wzbogacono o dodatek kompostu lub cieczy pofermentacyjnej. Dawki „polepszaczy" ustalono biorąc pod uwagą zawartość azotu i zastosowano w takiej ilości, aby pełna dawka nawozu odpowiadała maksymalnie dopuszczalnej, wynoszącej 170 kg $N \cdot ha^{-1}$ [Mazur i Maćkowiak 1978, Ustawa o nawozach i nawożeniu z dnia 10 lipca 2007 r]. W celu porównania zastosowano również dawki dwukrotnie mniejsze i dwukrotnie większe od optymalnej. Oznaczono je jako K1, K2 i K3 odpowiednio: dla gleby z najmniejszą, optymalną i największą dawką kompostu oraz F1, F2 i F3 – dla gleby z najmniejszą, optymalną i największą dawką cieczy pofermentacyjnej. Analizy chemiczne gleb z „polepszaczami" i gleby kontrolnej wykonano po zakończeniu badań mikrobiologicznych, tj. po około roku od założenia doświadczenia. „Polepszacze" poddano badaniom przed rozpoczęciem doświadczenia.

3.5.1. Badania gleby kontrolnej i gleb z dodatkiem kompostu i cieczy pofermentacyjnej

Oznaczenie właściwości fizykochemicznych gleby i kondycjonerów sporządzono na podstawie Ustawy o odpadach [2001], Rozporządzenia Ministra Środowiska w sprawie komunalnych osadów ściekowych [2002] i Rozporządzenia Ministra Środowiska w sprawie katalogu odpadów [2001]. Przeprowadzono następujące analizy:

a) pH – metodą elektrometryczną w wodzie,
b) zawartość substancji organicznej [% s.m.] – prażenie w temperaturze 600˚C,

c) zawartość azotu ogólnego – mineralizacja w środowisku kwaśnym z dodatkiem katalizatora (analizator firmy ELEMENTAR),
d) zawartość przyswajalnych związków fosforu w przeliczeniu P_2O_5 w mg·100 g^{-1} gruntu s.m.,
e) zawartość metali ciężkich: ołowiu, kadmu, chromu, miedzi, niklu, rtęci, cynku metodą spektrometrii absorpcji atomowej po mineralizacji mocnymi kwasami – w mg·kg^{-1} s.m.,
f) C_T – węgla organicznego, C_L – węgla labilnego, C_{NL} – węgla nielabilnego.

3.5.2. Badania kompostu i cieczy pofermentacyjnej

Analizy przeprowadzono pod kątem przydatności kompostu i cieczy pofermentacyjnej do stosowania w rolnictwie zgodnie z wytycznymi zawartymi w Załączniku 5. Rozporządzenia Ministra Środowiska z dnia 1 sierpnia 2002 r. w sprawie komunalnych osadów ściekowych [2002]. Przeprowadzono następujące analizy:
a) pH – metodą elektrometryczną w wodzie,
b) zawartość suchej masy,
c) zawartość substancji organicznej,
d) zawartość azotu ogólnego i amonowego,
e) zawartość fosforu ogólnego, wapnia i magnezu,
f) zawartość metali ciężkich: ołowiu, kadmu, chromu, miedzi, niklu, rtęci, cynku metodą spektrometrii absorpcji atomowej po mineralizacji mocnymi kwasami – w mg·kg^{-1} s.m.

Wykonano również oznaczenia węgla organicznego (C_T), węgla labilnego (C_L) i węgla nielabilnego (C_{NL}) w próbkach gleby kontrolnej, gleb z dodatkiem „polepszaczy" oraz samych „polepszaczy". Zawartość węgla organicznego oznaczano analizatorem TOC PRIMACS firmy Skalar, a utlenialność glebowego węgla organicznego w środowisku obojętnym metodą Łoginowa i wsp. [1993]. Zastosowanie metod chemicznego utleniania do oceny stanu próchnicy umożliwiło oznaczenie węgla utlenialnego i nieutlenialnego oraz jego frakcji ze względu na podatność na utlenianie. W metodzie Blaira i wsp. [1995] oparto się na dwóch frakcjach węglowych reprezentujących różną labilność wynikającą z podatności (lub jej braku) na utlenianie roztworem $KMnO_4$. Labilna forma węgla (C_L) podatna na utlenianie roztworem $KMnO_4$ uwzględnia sumę frakcji utlenialnych (FrI + II + III). Druga frakcja (Fr IV) obejmuje węgiel nielabilny (C_{NL}), który nie jest utleniany przez roztwór $KMnO_4$. Do próbek gleby zawierających około 15 mg C_T dodano 25 ml 333 mM $KMnO_4$ i wytrząsano przez 30 minut. Po oddzieleniu części stałych z próbki przez ich odwirowanie (2000 obrotów·min^{-1} w czasie 5 minut) oznaczono stężenie roztworu $KMnO_4$, miareczkując 0,05 M kwasem szczawiowym.

Oznaczenia zawartości metali ciężkich w gruncie były wykonane referencyjną metodą spektrometrii absorpcji atomowej, po mineralizacji mocnym kwasem. Oznaczenia metali wykonano w roztworach otrzymanych po minerali-

zacji w mieszaninie stężonych kwasów HF i HNO_3 techniką mikrofalową. Zawartość analizowanych pierwiastków oznaczono metodą spektrometrii absorpcji atomowej i spektrometrii emisyjnej, rtęć oznaczono na zimno, bez mineralizacji wstępnej próbki.

3.6. BADANIA MIKROBIOLOGICZNE GLEBY

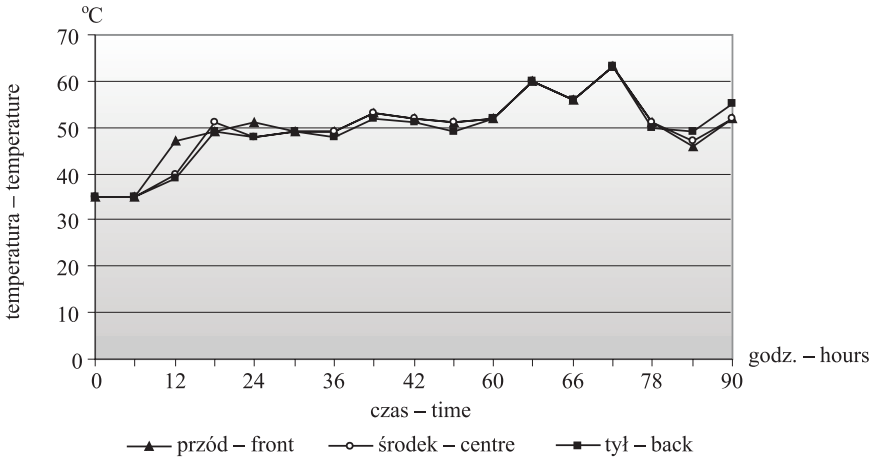
Przeprowadzono doświadczenie wazonowe, w którym wykorzystano glebę bez dodatku „polepszaczy" oraz wzbogaconą w różne dawki kompostu i cieczy pofermentacyjnej (podrozdz. 3.5.). Próbki do badań mikrobiologicznych gleb wzbogaconych o kompost pobierano po 107, 154, 214 i 270 dniach, natomiast w przypadku gleby z dodatkiem cieczy pofermentacyjnej – po 119, 145, 205, 258 i 290 dniach. Z każdego wazonu w odpowiednim terminie pobierano 10-gramowe próbki gleby i rozcieńczano w płynie Ringera (90 ml) w zakresie 10^{-1}-10^{-7}. Założono, że wprowadzenie do gleby kompostu i cieczy pofermentacyjnej, a wraz z nimi podstawowych pierwiastków biogennych może zwiększyć populację heterotroficznych mikroorganizmów autochtonicznych i wpłynąć na rozkład organicznej materii glebowej. Pula mikroorganizmów glebowych może dodatkowo ulec zwiększeniu za sprawą zymogenów obecnych w „polepszaczach". W związku z tym oznaczono ogólną liczbę bakterii na agarze odżywczym (Merck, 7881), ogólną liczbę grzybów [Martin 1950], drobnoustrojów amylolitycznych [Boguszewska 1980], celulolitycznych [Strzelczyk i Szpotański 1989], pektynolitcznych [Hankin i wsp.1971], proteolitycznych [Sobczak i wsp. 1978] i promieniowców [Pochon i Tradieux 1962]. Na podstawie ogólnej liczby bakterii, promieniowców oraz grzybów określono stan fitosanitarny badanej gleby po wprowadzeniu do niej kompostu i cieczy pofermentacyjnej.

4. WYNIKI

4.1. KOMPOSTOWANIE

Cykl 1. kompostowania

Temperatura na poziomie około 50°C utrzymywała się w całej biomasie kompostera od 18. do 60. godziny procesu (rys. 2). Po 60 godzinach zanotowano jej wzrost do poziomu 60°C, który z niewielkimi wahaniami utrzymywał się przez około 12 godzin. Maksymalna temperatura wyniosła 62,9°C.



Rys. 2. Przebieg temperatury w bioreaktorze w trakcie 1. cyklu kompostowania
Fig. 2. Time course of temperature in the bioreactor during cycle 1 of composting

Do inaktywacji bakterii *Escherichia coli* we wszystkich nośnikach doszło w 84. godzinie trwania procesu (tab. 1). Jednak już 36 godzin wcześniej nie wyizolowano pałeczek z kości. W nośnikach mięsnych stwierdzono spadek liczby bakterii o 2-5 cykli log po 24 godzinach oraz kolejne spadki po 36 i 48 godzinach, natomiast z nośników umieszczonych w kapsule nie wyizolowano badanych bakterii. Całkowity czas przeżywania *E. coli* był najkrótszy w nośnikach mięsnych pochodzących z przedniej części kompostera (78,8 godziny), natomiast najdłuższy (89,7 godziny) – w trzonie kości w przedniej części kompostera. Spadek liczby bakterii wahał się między 0,1 a 0,14 log/godzinę (tab. 2).

Tabela 1. Liczba pałeczek *E. coli* [NPL·g^{-1} lub NPL·ml^{-1}] w różnych nośnikach i miejscach kompostera w 1.cyklu kompostowania·

Table 1. The number of *E. coli* [MPN·g^{-1} or MPN·ml^{-1}] in different carriers and location in cycle 1 of composting

Typ nośnika Type of carrier	Lokalizacja próbek Sampling location	Czas [godz.] Time [h]				
		0	24	36	48	84
Mały nośnik mięsny Small meat carrier	przód front	$2{,}5\cdot10^{11}$	nw	$1{,}5\cdot10^{4}$	$0{,}9\cdot10^{3}$	nw nd
	środek centre	$2{,}5\cdot10^{11}$	$9{,}5\cdot10^{6}$	$1{,}5\cdot10^{5}$	$2{,}5\cdot10^{3}$	nw nd
	tył back	$2{,}5\cdot10^{11}$	$1{,}4\cdot10^{9}$	$4{,}5\cdot10^{4}$	$1{,}5\cdot10^{4}$	nw nd
Duży nośnik mięsny Big meat carrier	kapsuła capsule	$1{,}4\cdot10^{10}$	nb ne	nb ne	nb ne	nw nd
Trzon kości Femoral shaft	przód front	$1{,}4\cdot10^{10}$	$1{,}4\cdot10^{10}$	$3{,}0\cdot10^{8}$	$4{,}5\cdot10^{3}$	nw nd
	środek centre	$1{,}4\cdot10^{10}$	$1{,}4\cdot10^{10}$	$1{,}4\cdot10^{10}$	nw	nw nd
	tył back	$1{,}4\cdot10^{10}$	$1{,}4\cdot10^{10}$	$1{,}5\cdot10^{8}$	nw	nw nd
Główka kości Femoral head	kapsuła capsule	$1{,}4\cdot10^{10}$	nb ne	nb ne	nb ne	nw nd

nb – nie badano, ne – not examined
nw – nie wykryto, nd – not detected

Wpływ warunków kompostowania na przeżywalność pałeczek *Salmonella* Senftenberg W_{775} zauważalny był po dwóch dobach od umieszczenia ich w bioreaktorze (tab. 3). W nośnikach mięsnych w przedniej i środkowej części urządzenia doszło do całkowitej inaktywacji pałeczek *Salmonella*, natomiast w tylnej części stwierdzono ich redukcję o 6 cykli log. W trzonach kości liczba bakterii w drugiej dobie procesu była podobna jak na początku doświadczenia, jedynie z przodu kompostera uległa redukcji o 4 cykle log. Pałeczek nie wyizolowano z żadnego nośnika w 84. godzinie procesu. Całkowity czas przeżywania bakterii był krótszy w mięsie niż w kości (tab. 4). W nośnikach mięsnych wynosił on od 83,3 do 86,6 godzin, w zależności od miejsca w komposterze. Lokalizacja próbek nie miała natomiast wpływu na tempo inaktywacji pałeczek *Salmonella*, których szybkość wymierania w każdym przypadku wynosiła 0,14 log/godzinę. Bakterie przeżywały o około 20 godzin dłużej w trzonach kości niż w nośnikach mięsnych.

Tabela 2. Równania prostych regresji opisujących tempo inaktywacji pałeczek *E. coli* w 1. cyklu kompostowania
Table 2. Regression line equations describing the inactivation rate of *E. coli* in cycle 1 of composting

Typ nośnika Type of carrier	Lokalizacja próbek Sampling location	Równanie regresji Regression equations	Całkowity czas przeżywania [godz.] Total survival time [h]	Spadek liczby bakterii [log·godz.$^{-1}$] Fall of bacteria number [log·h^{-1}]
Mały nośnik mięsny Small meat carrier	przód front	y = - 0,10x + 7,88	78,8	0,10
	środek centre	y = - 0,13x + 10,54	81,0	0,13
	tył back	y = - 0,14x + 11,25	80,3	0,14
Trzon kości Femoral shaft	przód front	y = - 0,13x + 11,67	89,7	0,13
	środek centre	y = - 0,14x + 11,66	83,3	0,14
	tył back	y = - 0,14x + 11,21	80,0	0,14

Tabela 3. Liczba pałeczek *Salmonella* [NPL·g^{-1} lub NPL·ml^{-1}] w różnych nośnikach i miejscach kompostera w 1. cyklu kompostowania
Table 3. The number of *Salmonella* [MPN·g^{-1} or MPN·ml^{-1}] in different carriers and location in cycle 1 of composting

Typ nośnika Type of carrier	Lokalizacja próbek Sampling location	Czas [godz.] Time [h]				
		0	24	36	48	84
Mały nośnik mięsny Small meat carrier	przód front	$1{,}4\cdot10^{10}$	$1{,}4\cdot10^{10}$	$1{,}4\cdot10^{10}$	nw nd	nw nd
	środek centre	$1{,}4\cdot10^{10}$	$1{,}4\cdot10^{10}$	$1{,}4\cdot10^{10}$	nw nd	nw nd
	tył back	$1{,}4\cdot10^{10}$	$1{,}4\cdot10^{10}$	$1{,}4\cdot10^{10}$	$3{,}5\cdot10^{4}$	nw nd
Duży nośnik mięsny Big meat carrier	kapsuła capsule	$1{,}4\cdot10^{10}$	nb ne	nb ne	nb ne	nw nd
Trzon kości Femoral shaft	przód front	$1{,}4\cdot10^{10}$	$1{,}4\cdot10^{10}$	$1{,}4\cdot10^{10}$	$4{,}0\cdot10^{6}$	nw nd
	środek centre	$1{,}4\cdot10^{10}$	$1{,}4\cdot10^{10}$	$1{,}4\cdot10^{10}$	$1{,}1\cdot10^{10}$	nw nd
	tył back	$1{,}4\cdot10^{10}$	$1{,}4\cdot10^{10}$	$1{,}4\cdot10^{10}$	$1{,}4\cdot10^{10}$	nw nd
Główka kości Femoral head	kapsuła capsule	$1{,}4\cdot10^{10}$	nb ne	nb ne	nb ne	nw nd

objaśnienia pod tabelą 1 – for explanations, see Table 1

Tabela 4. Równania prostych regresji opisujących tempo inaktywacji pałeczek *Salmonella* w 1. cyklu kompostowania
Table 4. Regression line equations describing the inactivation rate of *Salmonella* in cycle 1 of composting

Typ nośnika Type of carrier	Lokalizacja próbek Sampling location	Równanie regresji Regression equations	Całkowity czas przeżywania [godz.] Total survival time [h]	Spadek liczby bakterii [log·godz.$^{-1}$] Fall of bacteria number [log·h^{-1}]
Mały nośnik mięsny Small meat carrier	przód front	y = - 0,14x + 11,66	83,3	0,14
	środek centre	y = - 0,14x + 11,66	83,3	0,14
	tył back	y = - 0,14x + 12,13	86,6	0,14
Trzon kości Femoral shaft	przód front	y = - 0,12x + 12,35	102,9	0,12
	środek centre	y = - 0,12x + 12,71	105,9	0,12
	tył back	y = - 0,12x + 12,72	106,0	0,12

Paciorkowce okazały się najbardziej opornymi bakteriami na warunki kompostowania. We wszystkich nośnikach ich liczba zmniejszyła się o 7 cykli log po 84 godzinach w porównaniu z czasem zerowym (tab. 5). W nośnikach mięsnych doszło do redukcji liczby paciorkowców o 2-3 cykle log już po 48 godzinach kompostowania, podczas gdy w trzonie kości, w tym samym czasie, ich liczba się nie zmieniła w porównaniu z próbką kontrolną. Całkowity czas ich przeżywania był dłuższy dla nośników kostnych i wahał się w granicach od 147,0 do 167,8 godziny w zależności od lokalizacji próbek (tab. 6). W nośnikach mięsnych okres potrzebny do całkowitej inaktywacji paciorkowców także był uzależniony od części urządzenia, w której umieszczono nośniki. Czas przeżycia bakterii w części przedniej i środkowej urządzenia był dłuższy – – 145,6 godziny, a w tylnej wynosił 125,8 godziny. Tempo eliminacji bakterii było zbliżone we wszystkich próbkach i wynosiło 0,07-0,09 log·godz.$^{-1}$.

Tabela 5. Liczba paciorkowców [NPL·g^{-1} lub NPL·ml^{-1}] w różnych nośnikach i miejscach kompostera w 1. cyklu kompostowania

Table 5. The number of streptococci [MPN·g^{-1} or MPN·ml^{-1}] in different carriers and location in cycle 1 of composting

Typ nośnika Type of carrier	Lokalizacja próbek Sampling location	Czas [godz.] Time [h]				
		0	24	36	48	84
Mały nośnik mięsny Small meat carrier	przód front	$1{,}4\cdot10^{10}$	$1{,}4\cdot10^{10}$	$1{,}4\cdot10^{10}$	$1{,}4\cdot10^{8}$	$2{,}5\cdot10^{3}$
	środek centre	$1{,}4\cdot10^{10}$	$1{,}4\cdot10^{10}$	$1{,}4\cdot10^{10}$	$1{,}4\cdot10^{8}$	$2{,}5\cdot10^{3}$
	tył back	$1{,}4\cdot10^{10}$	$1{,}4\cdot10^{10}$	$4{,}5\cdot10^{9}$	$1{,}4\cdot10^{6}$	$2{,}5\cdot10^{3}$
Duży nośnik mięsny Big meat carrier	kapsuła capsule	$1{,}4\cdot10^{10}$	nb ne	nb ne	nb ne	$2{,}5\cdot10^{3}$
Trzon kości Femoral shaft	przód front	$1{,}4\cdot10^{10}$	$1{,}4\cdot10^{10}$	$4{,}5\cdot10^{9}$	$1{,}4\cdot10^{10}$	$2{,}5\cdot10^{3}$
	środek centre	$1{,}4\cdot10^{10}$	$1{,}4\cdot10^{10}$	$1{,}4\cdot10^{10}$	$1{,}5\cdot10^{9}$	$2{,}5\cdot10^{3}$
	tył back	$1{,}4\cdot10^{10}$	$1{,}4\cdot10^{10}$	$1{,}4\cdot10^{10}$	$1{,}4\cdot10^{10}$	$2{,}5\cdot10^{3}$
Główka kości Femoral head	kapsuła capsule	$1{,}4\cdot10^{10}$	nb ne	nb ne	nb ne	$2{,}5\cdot10^{3}$

objaśnienia pod tabelą 1 – for explanations, see Table 1

Tabela 6. Równania prostych regresji opisujących tempo inaktywacji paciorkowców w 1. cyklu kompostowania

Table 6. Regression line equations describing the inactivation rate of streptococci in cycle 1 of composting

Typ nośnika Type of carrier	Lokalizacja próbek Sampling location	Równanie regresji Regression equations	Całkowity czas przeżywania [godz.] Total survival time [h]	Spadek liczby bakterii [log·godz.$^{-1}$] Fall of bacteria number [log·h^{-1}]
Mały nośnik mięsny Small meat carrier	przód front	y = - 0,08x + 11,65	145,6	0,08
	środek centre	y = - 0,08x + 11,65	145,6	0,08
	tył back	y = - 0,09x + 11,33	125,8	0,09
Trzon kości Femoral shaft	przód front	y = - 0,07x + 11,75	167,8	0,07
	środek centre	y = - 0,08x + 11,76	147,0	0,08
	tył back	y = - 0,08x + 11,86	148,3	0,08

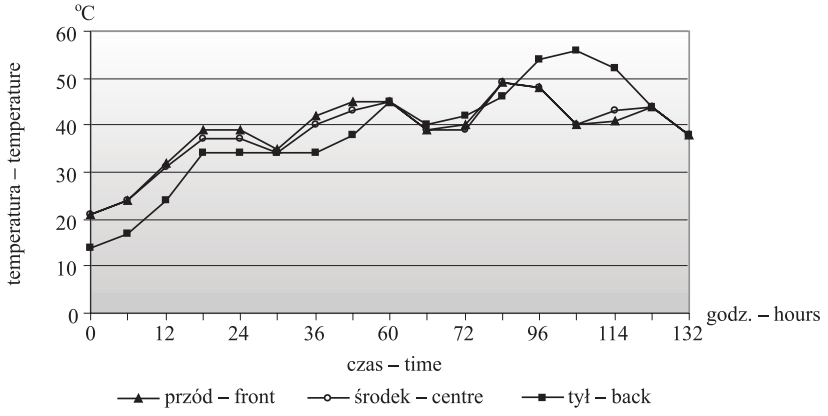
Wyniki badań parazytologicznych wskazują, że całkowita inaktywacja jaj *Ascaris suum* nastąpiła między 36. a 48. godziną kompostowania. Maksymalny czas przeżywania jaj obliczono na 3 doby, a redukcja liczby jaj inwazyjnych wynosiła od 1,55 do 2,17% w ciągu godziny (tab. 7).

Tabela 7. Średni odsetek jaj inwazyjnych *Ascaris suum* oraz proste regresji opisujące inaktywację jaj w 1. cyklu kompostowania
Table 7. Mean percentage of invasive eggs of *Ascaris sum* and regression line equations describing the inactivation rate of eggs in cycle 1 of composting

Lokalizacja próbek Sampling location	Czas [godz.] Time [h]					Równanie regresji Regression equations	Całkowity czas przeżywania jaj [godz.] Total time of egg survival [h]	Spadek liczby żywych jaj [%·godz.$^{-1}$] Fall in percentage of invasive eggs [%·h^{-1}]
	0	24	36	48	84			
Przód Front	93	88,6	5,3	0	0	y = -2,17x+105,21	48,56	2,17
Środek Centre	93	92	0	0	0	-	-	-
Tył Back	93	94	94	0	0	y = -1,55x+111,97	72,0	1,55

Cykl 2. kompostowania

Temperatura biomasy powoli rosła we wszystkich miejscach kompostera i ustaliła się na poziomie 35-45°C. Maksymalną jej wartość 57,2°C oznaczono po 100 godzinach w tylnej części bioreaktora, podczas gdy w przedniej i środkowej części spadła do ok. 40°C (rys. 3).



Rys. 3. Przebieg temperatury w bioreaktorze w trakcie 2. cyklu kompostowania
Fig. 3. Time course of temperature in the bioreactor during cycle 2 of composting

Pałeczek *E. coli* nie wyizolowano z żadnego nośnika po 126 godzinach trwania procesu kompostowania. W trzeciej dobie liczba ich zmniejszyła się średnio o 2-4 cykle log w obydwu rodzajach nośników – mięsnym i kostnym (tab. 8).

Tabela 8. Liczba pałeczek *E. coli* [NPL·g^{-1} lub NPL·ml^{-1}] w różnych nośnikach i miejscach kompostera w 2. cyklu kompostowania
Table 8. The number of *E. coli* [MPN·g^{-1} lub MPN·ml^{-1}] in different carriers and location in cycle 2 of composting

Typ nośnika Type of carrier	Lokalizacja próbek Sampling location	Czas [godz.] Time [h]			
		0	72	102	126
Mały nośnik mięsny Small meat carrier	przód front	$7{,}5\cdot10^{7}$	$9{,}5\cdot10^{5}$	nw nd	nw nd
	środek centre	$7{,}5\cdot10^{7}$	$2{,}5\cdot10^{7}$	nw nd	nw nd
	tył back	$7{,}5\cdot10^{7}$	$1{,}5\cdot10^{7}$	$0{,}4\cdot10^{4}$	nw nd
Duży nośnik mięsny Big meat carrier	kapsuła capsule	$2{,}5\cdot10^{6}$	nb ne	nb ne	nw nd
Trzon kości Femoral shaft	przód front	$9{,}5\cdot10^{8}$	$2{,}5\cdot10^{6}$	$4{,}5\cdot10^{9}$	nw nd
	środek centre	$9{,}5\cdot10^{8}$	$2{,}5\cdot10^{7}$	$0{,}9\cdot10^{6}$	nw nd
	tył back	$9{,}5\cdot10^{8}$	$9{,}5\cdot10^{4}$	$1{,}4\cdot10^{4}$	nw nd
Główka kości Femoral head	kapsuła capsule	$1{,}4\cdot10^{6}$	nb ne	nb ne	nw nd

objaśnienia pod tabelą 1 – for explanations, see Table 1

Po kolejnych 30 godzinach w nośnikach mięsnych nie stwierdzono obecności bakterii z wyjątkiem próbki z tylnej części kompostera, w której liczba bakterii spadła o kolejne 2 log. W tym samym czasie w kościach zanotowano wysoką koncentrację mikroorganizmów (rzędu 10^{4}-10^{9}). Tempo inaktywacji pałeczek *E. coli* wynosiło od 0,05 do 0,07 log·godz.$^{-1}$. Całkowity czas przeżywania był dłuższy dla bakterii w nośnikach kostnych (najdłuższy – z przodu urządzenia, tj. 194,4 godz.) w porównaniu z nośnikami mięsnymi (najkrótszy – z przodu urządzenia, tj. 123,1 godz.) (tab. 9).

Tabela 9. Równania prostych regresji opisujących tempo inaktywacji pałeczek *E. coli* w 2. cyklu kompostowania
Table 9. Regression line equations describing the inactivation rate of *E. coli* in cycle 2 of composting

Typ nośnika Type of carrier	Lokalizacja próbek Sampling location	Równanie regresji Regression equations	Całkowity czas przeżywania [godz.] Total survival time [h]	Spadek liczby bakterii [log·godz.$^{-1}$] Fall of bacteria number [log·h^{-1}]
Mały nośnik mięsny Small meat carrier	przód front	y = - 0,07x + 8,62	123,1	0,07
	środek centre	y = - 0,07x + 8,99	128,4	0,07
	tył back	y = - 0,05x + 8,93	178,6	0,05
Trzon kości Femoral shaft	przód front	y = - 0,05x + 9,72	194,4	0,05
	środek centre	y = - 0,06x + 9,98	166,3	0,06
	tył back	y = - 0,06x + 9,34	155,6	0,06

W 2. cyklu kompostowania nie wyizolowano bakterii z rodzaju *Salmonella* z żadnego nośnika. Pierwszy termin analiz przypadł na trzecią dobę trwania procesu, można więc przyjąć, że w tym okresie doszło do ich pełnej inaktywacji.

W analizowanym cyklu kompostowania paciorkowce podlegały bardzo powolnej eliminacji (tab. 10). W małych nośnikach mięsnych wykrywano je jeszcze w ostatnim terminie trwania procesu (tj. w 126 godz.). W trzonach kości w 102. godzinie kompostowania liczba paciorkowców była na poziomie porównywalnym z próbkami kontrolnymi. Po kolejnych 18 godzinach procesu doszło do ich całkowitej inaktywacji w nośnikach kostnych. Temperatura biomasy do około 100. godziny procesu kompostowania była zbyt niska, aby zapewnić redukcję bakterii we wszystkich nośnikach. Zaobserwowano nawet przyrost populacji bakterii. Dopiero między godziną 102. a 126. doszło do ich inaktywacji. W nośnikach mięsnych spadek liczby paciorkowców wynosił 0,03 log·godz.$^{-1}$, natomiast w nośnikach kostnych był on dwukrotnie wolniejszy (tab. 11). Najkrótszy czas potrzebny do całkowitej inaktywacji bakterii wynosił 148,4 godziny dla nośnika kostnego, a najdłuższy – 294,3 godzin dla nośnika mięsnego. Zaobserwowano znaczne różnice między przeżywalnością bakterii w obu typach nośników sięgające 100 godzin.

Tabela 10. Liczba paciorkowców [NPL·g^{-1} lub NPL·ml^{-1}] w różnych nośnikach i miejscach kompostera w 2. cyklu kompostowania

Table 10. The number of streptococci [MPN·g^{-1} or MPN·ml^{-1}] in different carriers and location in cycle 2 of composting

Typ nośnika Type of carrier	Lokalizacja próbek Sampling location	Czas [godz.] Time [h]			
		0	72	102	126
Mały nośnik mięsny Small meat carrier	przód front	$2,5\cdot10^{7}$	$2,5\cdot10^{8}$	$1,5\cdot10^{9}$	$0,4\cdot10^{2}$
	środek centre	$2,5\cdot10^{7}$	$7,5\cdot10^{8}$	$2,5\cdot10^{8}$	$0,4\cdot10^{2}$
	tył back	$2,5\cdot10^{7}$	$2,5\cdot10^{9}$	$2,5\cdot10^{8}$	$0,4\cdot10^{2}$
Duży nośnik mięsny Big meat carrier	kapsuła capsule	$2,5\cdot10^{6}$	nb ne	nb ne	nw nd
Trzon kości Femoral shaft	przód front	$4,5\cdot10^{9}$	$2,5\cdot10^{8}$	$2,5\cdot10^{10}$	nw nd
	środek centre	$4,5\cdot10^{9}$	$7,5\cdot10^{8}$	$0,4\cdot10^{6}$	nw nd
	tył back	$4,5\cdot10^{9}$	$9,5\cdot10^{5}$	$0,7\cdot10^{9}$	nw nd
Główka kości Femoral head	kapsuła capsule	$1,4\cdot10^{6}$	nb ne	nb ne	nw nd

objaśnienia pod tabelą 1 – for explanations, see Table 1

Tabela 11. Równania prostych regresji opisujących tempo inaktywacji paciorkowców w 2. cyklu kompostowania

Table 11. Regression line equations describing the inactivation rate of streptococci in cycle 2 of composting

Typ nośnika Type of carrier	Lokalizacja próbek Sampling location	Równanie regresji Regression equations	Całkowity czas przeżywania [godz.] Total survival time [h]	Spadek liczby bakterii [log·godz.$^{-1}$] Fall of bacteria number [log·h^{-1}]
Mały nośnik mięsny Small meat carrier	przód front	$y = -0,03x + 8,58$	286,0	0,03
	środek centre	$y = -0,03x + 8,70$	290,0	0,03
	tył back	$y = -0,03x + 8,83$	294,3	0,03
Trzon kości Femoral shaft	przód front	$y = -0,06x + 11,74$	195,6	0,06
	środek centre	$y = -0,08x + 11,87$	148,4	0,08
	tył back	$y = -0,06x + 11,10$	185,0	0,06

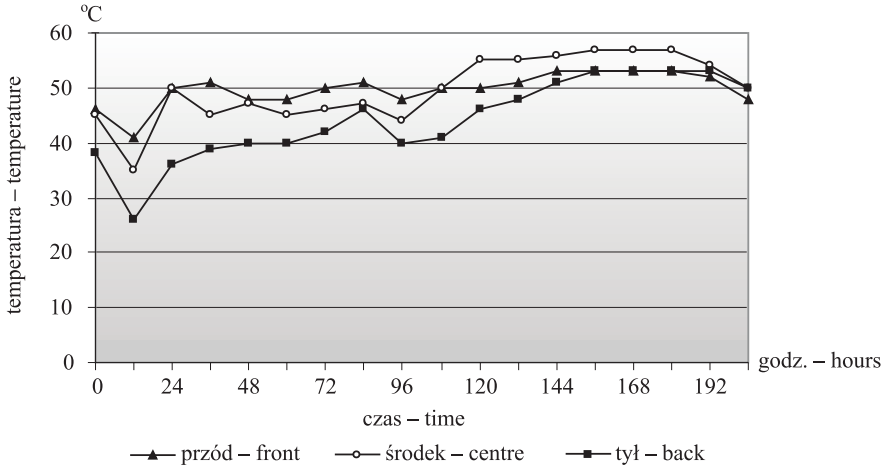
Stosunkowo niewysokie temperatury w 2. cyklu kompostowania wpłynęły na powolne obumieranie jaj *Ascaris suum*. Wykrywano je jeszcze w 102. godzinie procesu w wysokim odsetku. W ciągu kolejnej doby następowało dalsze ich obumieranie (tab. 12). Całkowity czas przeżywania jaj wahał się w przedziale od 154,3 do 200,4 godzin i nie był uzależniony od rozkładu temperatur w komposterze.

Tabela 12. Średni odsetek jaj inwazyjnych *Ascaris suum* oraz proste regresji opisujące inaktywację jaj w 2. cyklu kompostowania
Table 12. Mean percentage of invasive eggs of *Ascaris sum* and regression line equations describing the inactivation rate of eggs in cycle 2 of composting

Lokalizacja próbek Sampling location	Czas [godz.] Time [h]				Równanie regresji Regression equations	Całkowity czas przeżywania jaj [godz.] Total time of egg survival [h]	Spadek liczby żywych jaj [%·godz.$^{-1}$] Fall in percentage of invasive eggs [%·h^{-1}]
	0	72	102	126			
Przód Front	94	93	89,3	0	y = - 0,55x + 110,2	200,4	0,55
Środek Centre	94	89,3	38,3	0	y = - 0,70x + 108,0	154,3	0,70
Tył Back	94	74,6	49,6	0	y = - 0,66x + 104,2	157,9	0,66

Cykl 3. kompostowania

W pierwszej połowie cyklu temperatury pozostawały w przedziale 40-50°C, przy czym najniższe zanotowano z tyłu, a najwyższe w przedniej części urządzenia. W kolejnych dobach temperatura wzrastała, a wartość maksymalną (58,8°C) osiągnęła w ostatniej dobie cyklu w środkowej części urządzenia (rys. 4).



Rys. 4. Przebieg temperatury w bioreaktorze w trakcie 3. cyklu kompostowania
Fig. 4. Time course of temperature in the bioreactor during cycle 3 of composting

Inaktywacja bakterii *E. coli* we wszystkich nośnikach nastąpiła między 112. a 210. godziną kompostowania. Po 60 godzinach trwania procesu ich liczba nie zmalała w sposób znaczący, a w jednym przypadku nawet wzrosła (tab. 13). Kolejne analizy po 100 i 112 godzinach wskazywały na stopniową redukcję liczby pałeczek o 1-5 cykli log. We wszystkich nośnikach redukcja liczby bakterii była podobna i wynosiła 0,04 log·godz.$^{-1}$. Najdłużej przeżywały w trzonie kości z tyłu urządzenia – 284 godziny, natomiast najkrócej – w mięsie w przedniej części kompostera – 208,5 godziny (tab. 14).

Tabela 13. Liczba pałeczek *E. coli* [NPL·g^{-1} lub NPL·ml^{-1}] w różnych nośnikach i miejscach kompostera w 3. cyklu kompostowania

Table 13. The number of *E. coli* [MPN·g^{-1} or MPN·ml^{-1}] in different carriers and location in cycle 3 of composting

Typ nośnika Type of carrier	Lokalizacja próbek Sampling location	Czas [godz.] Time [h]				
		0	60	100	112	210
Mały nośnik mięsny Small meat carrier	przód front	$9{,}5\cdot10^{7}$	$9{,}5\cdot10^{6}$	$9{,}5\cdot10^{3}$	$2{,}5\cdot10^{3}$	nw nd
	środek centre	$9{,}5\cdot10^{7}$	$2{,}5\cdot10^{6}$	$2{,}5\cdot10^{5}$	$2{,}5\cdot10^{4}$	nw nd
	tył back	$9{,}5\cdot10^{7}$	$4{,}5\cdot10^{7}$	$9{,}5\cdot10^{5}$	$2{,}5\cdot10^{2}$	nw nd
Duży nośnik mięsny Big meat carrier	kapsuła capsule	$9{,}5\cdot10^{6}$	nb ne	nb ne	nb ne	nw nd
Trzon kości Femoral shaft	przód front	$9{,}5\cdot10^{7}$	$2{,}5\cdot10^{6}$	$4{,}5\cdot10^{4}$	$2{,}5\cdot10^{4}$	nw nd
	środek centre	$9{,}5\cdot10^{7}$	$4{,}5\cdot10^{8}$	$2{,}5\cdot10^{3}$	$2{,}5\cdot10^{3}$	nw nd
	tył back	$9{,}5\cdot10^{7}$	$4{,}5\cdot10^{4}$	$4{,}5\cdot10^{7}$	$4{,}5\cdot10^{4}$	nw nd
Główka kości Femoral head	kapsuła capsule	$9{,}5\cdot10^{7}$	nb ne	nb ne	nb ne	nw nd

objaśnienia pod tabelą 1 – for explanations, see Table 1

Tabela 14. Równania prostych regresji opisujących tempo inaktywacji pałeczek *E. coli* w 3. cyklu kompostowania
Table 14. Regression line equations describing the inactivation rate of *E. coli* in cycle 3 of composting

Typ nośnika Type of carrier	Lokalizacja próbek Sampling location	Równanie regresji Regression equations	Całkowity czas przeżywania [godz.] Total survival time [h]	Spadek liczby bakterii [log·godz.$^{-1}$] Fall of bacteria number [log·h^{-1}]
Mały nośnik mięsny Small meat carrier	przód front	y = - 0,04x + 8,34	208,5	0,04
	środek centre	y = - 0,04x + 8,54	213,5	0,04
	tył back	y = - 0,04x + 8,81	220,3	0,04
Trzon kości Femoral shaft	przód front	y = - 0,04x + 8,40	210,0	0,04
	środek centre	y = - 0,04x + 8,81	220,0	0,04
	tył back	y = - 0,03x + 8,52	284,0	0,03

Podobnie jak pałeczki okrężnicy, bakterie z rodzaju *Salmonella* uległy całkowitej inaktywacji między 112. a 210. godziną procesu kompostowania w cyklu 3. (tab. 15).

Tabela 15. Liczba pałeczek *Salmonella* [NPL·g^{-1} lub NPL·ml^{-1}] w różnych nośnikach i miejscach kompostera w 3. cyklu kompostowania
Table 15. The number of *Salmonella* [MPN·g^{-1} or MPN·ml^{-1}] in different carriers and location in cycle 3 of composting

Typ nośnika Type of carrier	Lokalizacja próbek Sampling location	Czas [godz.] Time [h]				
		0	60	100	112	210
Mały nośnik mięsny Small meat carrier	przód front	$2{,}5\cdot10^{9}$	$2{,}5\cdot10^{8}$	$4{,}5\cdot10^{5}$	$1{,}5\cdot10^{6}$	nw nd
	środek centre	$2{,}5\cdot10^{9}$	$3{,}0\cdot10^{7}$	$1{,}5\cdot10^{7}$	$9{,}5\cdot10^{4}$	nw nd
	tył back	$2{,}5\cdot10^{9}$	$9{,}5\cdot10^{8}$	$4{,}5\cdot10^{7}$	$9{,}5\cdot10^{2}$	nw nd
Duży nośnik mięsny Big meat carrier	kapsuła capsule	$1{,}4\cdot10^{10}$	nb ne	nb ne	nb ne	nw nd
Trzon kości Femoral shaft	przód front	$9{,}5\cdot10^{8}$	$4{,}5\cdot10^{10}$	$1{,}5\cdot10^{9}$	$1{,}5\cdot10^{8}$	nw nd
	środek centre	$9{,}5\cdot10^{8}$	$1{,}5\cdot10^{10}$	$9{,}5\cdot10^{6}$	$9{,}5\cdot10^{6}$	nw nd
	tył back	$9{,}5\cdot10^{8}$	$4{,}5\cdot10^{6}$	$9{,}5\cdot10^{8}$	$2{,}5\cdot10^{5}$	nw nd
Główka kości Femoral head	kapsuła capsule	$1{,}4\cdot10^{10}$	nb ne	nb ne	nb ne	nw nd

objaśnienia pod tabelą 1 – for explanations, see Table 1

W trakcie pierwszych 112 godz. obserwowano stopniowy spadek liczby pałeczek w nośnikach mięsnych o 3-7 cykli log. W kościach, w dwóch przypadkach, doszło do namnożenia bakterii. Tempo inaktywacji wynosiło 0,04-0,05 log·godz.$^{-1}$, a całkowity czas przeżywania zależał od lokalizacji próbek w urządzeniu. Pałeczki *Salmonella* najdłużej przetrwały w mięsie w środkowej części urządzenia, bo aż 254 godz., a najkrócej w mięsie w przedniej części kompostera, tj. 207 godz. (tab. 16).

Tabela 16. Równania prostych regresji opisujących tempo inaktywacji pałeczek *Salmonella* w 3. cyklu kompostowania

Table 16. Regression line equations describing the inactivation rate of *Salmonella* in cycle 3 of composting

Typ nośnika Type of carrier	Lokalizacja próbek Sampling location	Równanie regresji Regression equations	Całkowity czas przeżywania [godz.] Total survival time [h]	Spadek liczby bakterii [log·godz.$^{-1}$] Fall of bacteria number [log·h^{-1}]
Mały nośnik mięsny Small meat carrier	przód front	y = - 0,05x + 10,36	207,0	0,05
	środek centre	y = - 0,04x + 10,16	254,0	0,04
	tył back	y = - 0,05x + 10,50	210,0	0,05
Trzon kości Femoral shaft	przód front	y = - 0,05x + 11,83	236,0	0,05
	środek centre	y = - 0,05x + 11,09	221,8	0,05
	tył back	y = - 0,04x + 9,99	249,8	0,04

Jeszcze po 112 godzinach trwania procesu kompostowania cyklu 3. wykrywano paciorkowce w nośnikach mięsnych i kostnych (tab. 17). Do tego czasu liczba bakterii ulegała wahaniom związanym również z namnożeniem komórek. W trzecim terminie analiz (112 godz.) koncentracja bakterii w nośnikach mięsnych była taka sama lub większa niż na początku procesu. Odmiennie było w przypadku paciorkowców wprowadzonych w trzony kości, w których zaobserwowano spadek ich liczby o 2-3 cykle log z wyjątkiem nośnika w części środkowej kompostera. Całkowity czas przeżycia bakterii wahał się w granicach 321,5-366,5 godzin. Paciorkowce przeżywały najdłużej w trzonie kości w środkowej części kompostera, a najkrócej – również w kości z tyłu urządzenia. We wszystkich przypadkach tempo eliminacji paciorkowców było takie samo i wynosiło 0,02 log·godz.$^{-1}$ (tab. 18).

Tabela 17. Liczba paciorkowców kałowych [NPL·g^{-1} lub NPL·ml^{-1}] w różnych nośnikach i miejscach kompostera w 3. cyklu kompostowania
Table 17. The number of streptococci [MPN·g^{-1} or MPN·ml^{-1}] in different carriers and location in cycle 3 of composting

Typ nośnika Type of carrier	Lokalizacja próbek Sampling location	Czas [godz.] Time [h]				
		0	60	100	112	210
Mały nośnik mięsny Small meat carrier	przód front	$1{,}5\cdot10^{4}$	$2{,}5\cdot10^{7}$	$1{,}5\cdot10^{6}$	$4{,}5\cdot10^{4}$	nw nd
	środek centre	$1{,}5\cdot10^{4}$	$4{,}5\cdot10^{6}$	$2{,}5\cdot10^{5}$	$7{,}5\cdot10^{5}$	nw nd
	tył back	$1{,}5\cdot10^{4}$	$4{,}5\cdot10^{7}$	$2{,}5\cdot10^{6}$	$2{,}5\cdot10^{5}$	nw nd
Duży nośnik mięsny Big meat carrier	kapsuła capsule	$1{,}4\cdot10^{10}$	nb ne	nb ne	nb ne	nw nd
Trzon kości Femoral shaft	przód front	$2{,}5\cdot10^{5}$	$2{,}5\cdot10^{6}$	$9{,}5\cdot10^{4}$	$4{,}5\cdot10^{2}$	nw nd
	środek centre	$2{,}5\cdot10^{5}$	$9{,}5\cdot10^{5}$	$2{,}5\cdot10^{6}$	$2{,}5\cdot10^{6}$	nw nd
	tył back	$2{,}5\cdot10^{5}$	$7{,}5\cdot10^{4}$	$4{,}5\cdot10^{5}$	$4{,}5\cdot10^{3}$	nw nd
Główka kości Femoral head	kapsuła capsule	$1{,}4\cdot10^{10}$	nb ne	nb ne	nb ne	nw nd

objaśnienia pod tabelą 1 – for explanations, see Table 1

Tabela 18. Równania prostych regresji opisujących tempo inaktywacji paciorkowców w 3. cyklu kompostowania
Table 18. Regression line equations describing the inactivation rate of streptococci in cycle 3 of composting

Typ nośnika Type of carrier	Lokalizacja próbek Sampling location	Równanie regresji Regression equations	Całkowity czas przeżywania [godz.] Total survival time [h]	Spadek liczby bakterii [log·godz.$^{-1}$] Fall of bacteria number [log·h^{-1}]
Mały nośnik mięsny Small meat carrier	przód front	y = - 0,02x + 6,82	341,0	0,02
	środek centre	y = - 0,02x + 6,58	329,0	0,02
	tył back	y = - 0,02x + 7,05	352,0	0,02
Trzon kości Femoral shaft	przód front	y = - 0,02x + 6,70	335,0	0,02
	środek centre	y = - 0,02x + 7,33	366,5	0,02
	tył back	y = - 0,02x + 6,43	321,5	0,02

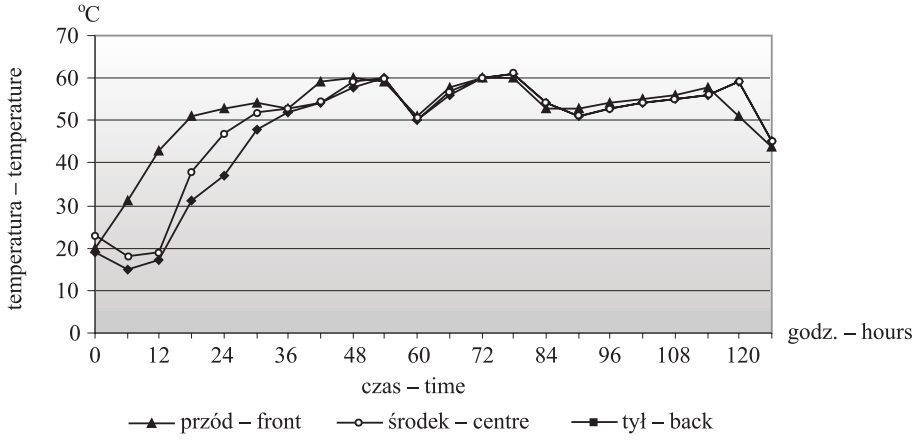
Żywych jaj *Ascaris suum* nie wykryto w 112. godzinie procesu kompostowania w cyklu 3. Jedynie w przedniej części urządzenia obumarły 12 godzin wcześniej (tab. 19). Całkowity czas przeżywania jaj wynosił tydzień. Zmniejszenie liczby żywych jaj następowało w tempie 0,62-0,77% w ciągu godziny.

Tabela 19. Średni odsetek jaj inwazyjnych *Ascaris suum* oraz proste regresji opisujące inaktywację jaj w 3. cyklu kompostowania
Table 19. Mean percentage of invasive eggs of *Ascaris sum* and regression line equations describing the inactivation rate of eggs in cycle 3 of composting

Lokalizacja próbek Sampling location	Czas [godz.] Time [h]					Równanie regresji Regression equations	Całkowity czas przeżywania jaj [godz.] Total time of egg survival [h]	Spadek liczby żywych jaj [%·godz.$^{-1}$] Fall in percentage of invasive eggs [%·h^{-1}]
	0	60	100	112	210			
Przód Front	94	94,6	0	0	0	-	-	-
Środek Centre	94	82,3	36,6	0	0	y=-0,77x+105,5	81,2	0,77
Tył Back	94	93,6	74	0	0	y=-0,62x+107,8	173,8	0,62

Cykl 4. kompostowania

W pierwszych godzinach cyklu nastąpiło widoczne ochłodzenie w przedniej i środkowej części kompostera związane z wprowadzeniem odpadów i wpływem temperatury panującej na zewnątrz (rys. 5). Na początku trzeciej doby temperatura osiągnęła maksymalną wartość 61,7ºC, po czym utrzymywała się w granicach 50-60^{o}C do końca prowadzonych doświadczeń.



Rys. 5. Przebieg temperatury w bioreaktorze w trakcie 4. cyklu kompostowania
Fig. 5. Time course of temperature in the bioreactor during cycle 4 of composting

Już w trzeciej dobie 4. cyklu kompostowania nie wyizolowano pałeczek *Salmonella* z większości nośników. W trzonach kości uległy one inaktywacji o dobę wcześniej niż w mięsie (tab. 20). W nośnikach kostnych w przedniej części kompostera przeżywalność pałeczek wyniosła 83,2 godziny, w pozostałych lokalizacjach inaktywacja bakterii nastąpiła już po 24 godzinach, dlatego nie wyznaczono prostych regresji (tab. 21). Przeżywalność pałeczek *Salmonella* w nośnikach mięsnych była zbliżona i wahała się w granicach 69,3-75,6 godzin.

Tabela 20. Liczba pałeczek *Salmonella* [NPL·g^{-1} lub NPL·ml^{-1}] w różnych nośnikach i miejscach kompostera w 4. cyklu kompostowania

Table 20. The number of *Salmonella* [MPN·g^{-1} or MPN·ml^{-1}] in different carriers and location in cycle 4 of composting

Typ nośnika Type of carrier	Lokalizacja próbek Sampling location	Czas [godz.] Time [h]				
		0	24	48	72	120
Mały nośnik mięsny Small meat carrier	przód front	$2{,}5\cdot10^{10}$	$2{,}0\cdot10^{8}$	$7{,}5\cdot10^{2}$	nw nd	nw nd
	środek centre	$2{,}5\cdot10^{10}$	$2{,}0\cdot10^{8}$	$7{,}5\cdot10^{2}$	nw nd	nw nd
	tył back	$2{,}5\cdot10^{10}$	$15\cdot10^{4}$	$9{,}5\cdot10^{3}$	nw nd	nw nd
Duży nośnik mięsny Big meat carrier	kapsuła capsule	$2{,}5\cdot10^{10}$	nb ne	nb ne	nb ne	nw nd
Trzon kości Femoral shaft	przód front	$4{,}5\cdot10^{10}$	$1{,}5\cdot10^{6}$	nw	$7{,}5\cdot10^{3}$	nw nd
	środek centre	$4{,}5\cdot10^{10}$	$2{,}5\cdot10^{10}$	nw	nw	nw nd
	tył back	$4{,}5\cdot10^{10}$	$1{,}5\cdot10^{7}$	nw	nw	nw nd
Główka kości Femoral head	kapsuła capsule	$2{,}5\cdot10^{10}$	nb ne	nb ne	nb ne	nw nd

objaśnienia pod tabelą 1 – for explanations, see Table 1

Tabela 21. Proste regresji opisujące tempo inaktywacji pałeczek *Salmonella w* 4. cyklu kompostowania
Table 21. Regression line equations describing the inactivation rate of *Salmonella* in cycle 4 of composting

Typ nośnika Type of carrier	Lokalizacja próbek Sampling location	Równanie regresji Regression equations	Całkowity czas przeżywania [godz.] Total survival time [h]	Spadek liczby bakterii [log·godz.$^{-1}$] Fall of bacteria number [log·h^{-1}]
Mały nośnik mięsny Small meat carrier	przód front	y = - 0,17x + 11,78	69,3	0,17
	środek centre	y = - 0,15x + 10,56	70,4	0,15
	tył back	y = - 0,16x + 12,1	75,6	0,16
Trzon kości Femoral shaft	przód front	y = - 0,11x + 9,15	83,2	0,11
	środek centre	-	-	-
	tył back	-	-	-

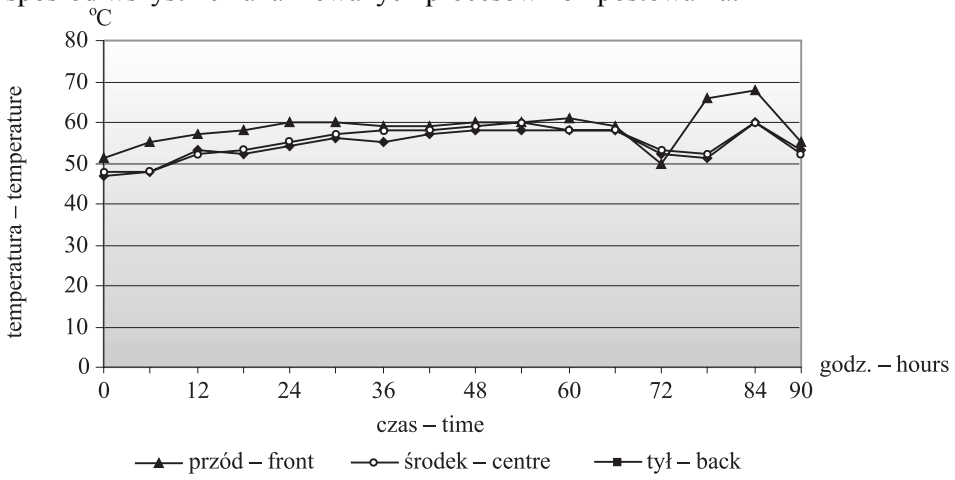
Zawartość jaj inwazyjnych w próbce kontrolnej kształtowała się na poziomie 94%. Do inaktywacji wszystkich jaj w badanym cyklu kompostowania doszło w pierwszej dobie procesu (tab. 22).

Tabela 22. Średni odsetek jaj inwazyjnych *Ascaris suum* w różnych miejscach kompostera w 4. cyklu kompostowania
Table 22. Mean percentage of invasive eggs of *Ascaris sum* in different location in cycle 4 of composting

Lokalizacja próbek Sampling location	Czas [godz.] Time [h]				
	0	24	48	72	120
Przód Front	94	0	0	0	0
Środek Centre	94	0	0	0	0
Tył Back	94	0	0	0	0

Cykl 5. kompostowania

Temperatura biomasy od momentu umieszczenia próbek w komposterze utrzymywała się na stałym poziomie w granicach 50-60ºC przez około 66 godzin procesu (rys. 6). Wartość maksymalną (68,1ºC) zanotowano w tylnej części urządzenia w 84. godzinie. W cyklu 5. zanotowano najwyższe temperatury spośród wszystkich analizowanych procesów kompostowania.



Rys. 6. Przebieg temperatury w bioreaktorze w trakcie 5. cyklu kompostowania
Fig. 6. Time course of temperature in the bioreactor during cycle 5 of composting

W cyklu tym zniszczeniu uległy nośniki zawierające pałeczki *Salmonella* i paciorkowce. Ze względu jednak na korzystne, dla wystąpienia sanityzacji, warunki termiczne panujące w trakcie tego cyklu przedstawiono ich wpływ tylko na pałeczki *E. coli* i jaja *A. suum*. Pałeczek *E. coli* z większości nośników nie wyizolowano już w 24. godzinie kompostowania (tab. 23). Jedynie próbka mięsna z przedniej lokalizacji zawierała bakterie. Należy to tłumaczyć nieco niższą temperaturą w tej części kompostera. Począwszy od 48. godziny z żadnego nośnika nie wyizolowano pałeczek okrężnicy.

Tabela 23. Liczba pałeczek *E. coli* [NPL·g^{-1} lub NPL·ml^{-1}] w różnych nośnikach i miejscach kompostera w 5. cyklu kompostowania

Table 23. The number of *E. coli* [MPN·g^{-1} or MPN·ml^{-1}] in different carriers and location in cycle 5 of composting

Typ nośnika Type of carrier	Lokalizacja próbek Sampling location	Czas [godz.] Time [h]				
		0	24	48	72	120
Mały nośnik mięsny Small meat carrier	przód front	$2{,}5\cdot10^{10}$	$2{,}5\cdot10^{3}$	nw nd	nw nd	nw nd
	środek centre	$2{,}5\cdot10^{10}$	nw nd	nw nd	nw nd	nw nd
	tył back	$2{,}5\cdot10^{10}$	nw nd	nw nd	nw nd	nw nd
Duży nośnik mięsny Big meat carrier	kapsuła capsule	$4{,}5\cdot10^{10}$	nb ne	nb ne	nb ne	nw nd
Trzon kości Femoral shaft	przód front	$4{,}5\cdot10^{9}$	nw nd	nw nd	nw nd	nw nd
	środek centre	$4{,}5\cdot10^{9}$	nw nd	nw nd	nw nd	nw nd
	tył back	$4{,}5\cdot10^{9}$	nw nd	nw nd	nw nd	nw nd
Główka kości Femoral head	kapsuła capsule	$2{,}5\cdot10^{9}$	nb ne	nb ne	nb ne	nw nd

objaśnienia pod tabelą 1 – for explanations, see Table 1

Analogicznie jak w przypadku bakterii, po pierwszej dobie kompostowania nie stwierdzono w nośnikach żywych jaj *Ascaris suum* (tab. 24).

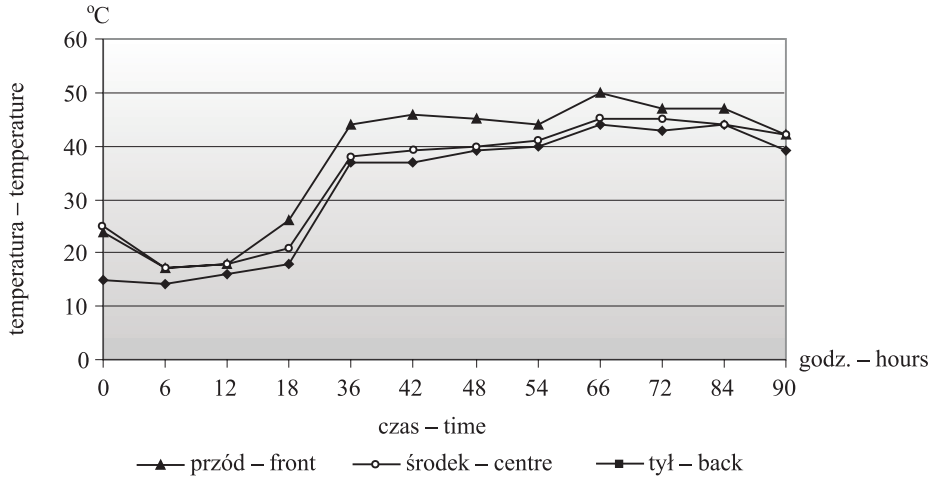
Tabela 24. Średni odsetek jaj inwazyjnych *Ascaris suum* w różnych miejscach kompostera w 5. cyklu kompostowania

Table 24. Mean percentage of invasive eggs of *Ascaris sum* in different location in cycle 5 of composting

Lokalizacja próbek Sampling location	Czas [godz.] Time [h]				
	0	24	48	72	120
Przód Front	94	0	0	0	0
Środek Centre	94	0	0	0	0
Tył Back	94	0	0	0	0

Cykl 6. kompostowania

Zmiany temperatury biomasy w trakcie trwania procesu przedstawiono na rysunku 7. Po załadunku temperatura w środkowej i tylnej części reaktora obniżyła się do ok. 15°C. Pod koniec pierwszej doby zaczęła rosnąć, a maksymalna jej wartość wyniosła 49,8ºC w tylnej części reaktora w 66. godzinie procesu. Biomasa w przedniej i środkowej części kompostera była średnio o 5ºC chłodniejsza niż w tylnej części w ciągu trwania całego cyklu.



Rys. 7. Przebieg temperatury w bioreaktorze w trakcie 6. cyklu kompostowania
Fig. 7. Time course of temperature in the bioreactor during cycle 6 of composting

Pałeczki okrężnicy podlegały stopniowej inaktywacji we wszystkich nośnikach do 96. godziny procesu kompostowania (tab. 25). Szybciej też ginęły w nośnikach kostnych (0,05-0,06 log·godz.$^{-1}$) niż w mięsnych (0,03-0,05 log·godz.$^{-1}$). Temperatura w zakresie od 20 do 30°C na początku procesu najprawdopodobniej spowodowała namnożenie mikroorganizmów. W większości nośników liczba ich kształtowała się na podobnym poziomie jak w próbkach kontrolnych jeszcze w 72. godzinie procesu. Całkowity czas przeżywania *E. coli* wynosił 169,8-209 godz. (tab. 26).

Tabela 25. Liczba pałeczek *E. coli w* [NPL·g^{-1} lub NPL·ml^{-1}] w różnych nośnikach i miejscach kompostera w 6. cyklu kompostowania
Table 25. The number of *E. coli* [MPN·g^{-1} lub MPN·ml^{-1}] in different carriers and location in cycle 6 of composting

Typ nośnika Type of carrier	Lokalizacja próbek Sampling location	Czas [godz.] Time [h]				
		0	48	72	96	120
Mały nośnik mięsny Small meat carrier	przód front	$4{,}5\cdot10^{7}$	$1{,}5\cdot10^{8}$	$4{,}5\cdot10^{3}$	$9{,}5\cdot10^{2}$	nb ne
	środek centre	$4{,}5\cdot10^{7}$	$1{,}5\cdot10^{8}$	$4{,}5\cdot10^{5}$	$2{,}5\cdot10^{3}$	nb ne
	tył back	$4{,}5\cdot10^{7}$	$4{,}5\cdot10^{7}$	$4{,}5\cdot10^{6}$	$2{,}5\cdot10^{4}$	nb ne
Trzon kości Femoral shaft	przód front	$9{,}5\cdot10^{9}$	$9{,}5\cdot10^{8}$	$2{,}5\cdot10^{9}$	$4{,}5\cdot10^{2}$	nb ne
	środek centre	$9{,}5\cdot10^{9}$	$1{,}5\cdot10^{8}$	$4{,}5\cdot10^{8}$	$2{,}5\cdot10^{4}$	nb ne
	tył back	$9{,}5\cdot10^{9}$	$4{,}0\cdot10^{8}$	$4{,}5\cdot10^{8}$	$4{,}5\cdot10^{2}$	nb ne

nb – nie badano, ne – not examined

Tabela 26. Proste regresji opisujące tempo inaktywacji *E. coli* w 6. cyklu kompostowania
Table 26. Regression line equations describing the inactivation rate of *E. coli* in cycle 6 of composting

Typ nośnika Type of carrier	Lokalizacja próbek Sampling location	Równanie regresji Regression equations	Całkowity czas przeżywania [godz.] Total survival time [h]	Spadek liczby bakterii [log·godz.$^{-1}$] Fall of bacteria number [log·h^{-1}]
Mały nośnik mięsny Small meat carrier	przód front	$y = -0{,}05x + 8{,}52$	170,4	0,05
	środek centre	$y = -0{,}05x + 8{,}49$	169,8	0,05
	tył back	$y = -0{,}03x + 8{,}19$	273,0	0,03
Trzon kości Femoral shaft	przód front	$y = -0{,}06x + 11{,}09$	184,8	0,06
	środek centre	$y = -0{,}05x + 10{,}45$	209,0	0,05
	tył back	$y = -0{,}06x + 10{,}93$	182,2	0,06

Podobnie jak w przypadku bakterii *E. coli* do 96. godziny procesu obserwowano stopniową redukcję liczby pałeczek *Salmonella* we wszystkich nośnikach i miejscach kompostera o 3-6 log (tab. 27). W 120. godzinie kompostowania

nie wyizolowano bakterii z żadnego nośnika. Maksymalny czas ich przeżywania wynosił nawet 513,5 godz., a najkrótszy obliczono na 205,2 godz. (tab. 28).

Tabela 27. Liczba pałeczek *Salmonella* [NPL·g^{-1} lub NPL·ml^{-1}] w różnych nośnikach i miejscach kompostera w 6. cyklu kompostowania
Table 27. The number of *Salmonella* [MPN·g^{-1} or MPN·ml^{-1}] in different carriers and location in cycle 6 of composting

Typ nośnika Type of carrier	Lokalizacja próbek Sampling location	Czas [godz.] Time [h]				
		0	48	72	96	120
Mały nośnik mięsny Small meat carrier	przód front	$4{,}5\cdot10^{7}$	$4{,}5\cdot10^{7}$	$4{,}5\cdot10^{4}$	$9{,}5\cdot10^{3}$	nb ne
	środek centre	$4{,}5\cdot10^{7}$	$2{,}5\cdot10^{7}$	$2{,}5\cdot10^{7}$	$1{,}5\cdot10^{3}$	nb ne
	tył back	$4{,}5\cdot10^{7}$	$4{,}5\cdot10^{7}$	$2{,}5\cdot10^{8}$	$9{,}5\cdot10^{4}$	nb ne
Trzon kości Femoral shaft	przód front	$1{,}5\cdot10^{10}$	$2{,}5\cdot10^{9}$	$2{,}5\cdot10^{8}$	$9{,}5\cdot10^{7}$	nb ne
	środek centre	$1{,}5\cdot10^{10}$	$4{,}5\cdot10^{7}$	$2{,}5\cdot10^{8}$	$9{,}5\cdot10^{4}$	nb ne
	tył back	$1{,}5\cdot10^{10}$	$1{,}5\cdot10^{9}$	$2{,}5\cdot10^{8}$	$9{,}5\cdot10^{4}$	nb ne

nb – nie badano, ne – not examined

Tabela 28. Proste regresji opisujące tempo inaktywacji pałeczek *Salmonella* w 6. cyklu kompostowania
Table 28. Regression line equations describing the inactivation rate of *Salmonella* in cycle 6 of composting

Typ nośnika Type of carrier	Lokalizacja próbek Sampling location	Równanie regresji Regression equations	Całkowity czas przeżywania [godz.] Total survival time [h]	Spadek liczby bakterii [log·godz.$^{-1}$] Fall of bacteria number [log·h^{-1}]
Mały nośnik mięsny Small meat carrier	przód front	$y = -0{,}04x + 8{,}21$	205,2	0,04
	środek centre	$y = -0{,}04x + 8{,}45$	211,2	0,04
	tył back	$y = -0{,}02x + 8{,}23$	411,5	0,02
Trzon kości Femoral shaft	przód front	$y = -0{,}02x + 10{,}27$	513,5	0,02
	środek centre	$y = -0{,}05x + 10{,}32$	206,4	0,05
	tył back	$y = -0{,}05x + 10{,}8$	216,0	0,05

Nośniki zawierające paciorkowce kałowe uległy zniszczeniu w trakcie tego cyklu kompostowania.

Odsetek jaj inwazyjnych *Ascaris suum* nie uległ znaczącemu zmniejszeniu w trakcie trwania procesu zarówno po 48 godzinach, jak i w kolejnych odstępach czasu, procent jaj inwazyjnych utrzymywał się na bardzo wysokim poziomie (tab. 29). Całkowity czas przeżywania jaj obliczono na 1-2 miesiące. W tylnej części urządzenia, w której panowała najwyższa temperatura przez cały czas kompostowania, spadek żywotności jaj nie był największy, czego można się było spodziewać. Najdłuższy czas utrzymania żywotności wyliczono dla jaj umieszczonych w środkowej części kompostera. Wyniósł on 1302,8 godziny, czyli ponad 50 dni, dwukrotnie więcej niż w pozostałych lokalizacjach.

Tabela 29. Średni odsetek jaj inwazyjnych *Ascaris suum* oraz proste regresji opisujące inaktywację jaj w 6. cyklu kompostowania

Table 29. Mean percentage of invasive eggs of *Ascaris sum* and regression line equations describing the inactivation rate of eggs in cycle 6 of composting

Lokalizacja próbek Sampling location	Czas [godz.] Time [h]				Równanie regresji Regression equations	Całkowity czas przeżywania jaj [godz.] Total time of egg survival [h]	Spadek liczby żywych jaj [%·godz.$^{-1}$] Fall in percentage of invasive eggs [%·h^{-1}]
	0	48	72	96			
Przód Front	95	86	86	76	y = -0,18x + 91,2	506,6	0,18
Środek Centre	95	84	78	92	y = -0,07x + 91,2	1 302,8	0,07
Tył Back	95	94	72	88	y = -0,14x + 94,8	677,1	0,14

Wyniki badań wirusologicznych przeprowadzonych w trakcie procesów kompostowania

PARWOWIRUSY BYDLĘCE (BPV)

Badania przeżywalności wirusów BPV przeprowadzono w trakcie trwania dwóch cykli kompostowania – w cyklu 2. z t_{max} 57,2°C oraz w cyklu nr 5, w trakcie którego zanotowano najwyższe temperatury biomasy (68,1°C). Jak wynika z tabeli 30 najszybciej miano parwowirusów bydlęcych (BPV) spadało w zawiesinie w eppendorfie. Mogło to być spowodowane niewielkim działaniem ochronnym ścian probówki przed wpływem wysokiej temperatury. Nośnik wykonany z mięsa i kości zdecydowanie lepiej chronił zaadsorbowane na filtrach wirusy BPV przed oddziaływaniem temperatury. Inaktywacja parwowirusów następowała najwolniej w nośniku kostnym. Przeżywalność mikroorganizmów wahała się w granicach od 171,1 do 225,2 godzin (tab. 31).

Tabela 30. Średnie miana wirusa BPV [$logTCID_{50} \cdot ml^{-1}$] w różnych nośnikach w 2. cyklu kompostowania
Table 30. Mean titres of BPV [$logTCID_{50} \cdot ml^{-1}$] in different carriers in cycle 2 of composting

Typ nośnika Type of carrier	t_{max}	Czas [godz.] Time [h]			
		0	72	102	126
Mięso mielone (filtr) Minced meat (filter)	57,2°C	5,8	4,8	3,3	1,8
Trzon kości (filtr) Femoral shaft (filter)			4,8	3,3	2,3
Zawiesina (eppendorf) Virus suspension (eppendorf)			4,55	2,3	1,3

Tabela 31. Proste regresji opisujące tempo inaktywacji wirusów BPV w 2. cyklu kompostowania
Table 31. Regression lines describing survival of BPV in cycle 2 of composting

Typ nośnika Type of carrier	Równanie regresji Regression equations	Całkowity czas przeżywania [godz.] Total survival time [h]	Spadek miana wirusa [$log \cdot godz.^{-1}$] Fall of titer [$log \cdot h^{-1}$]
Mięso mielone (filtr) Minced meat (filter)	y = -0,03x+6,17	205,6	0,03
Trzon kości (filtr) Femoral shaft (filter)	y = - 0,027x + 6,08	225,2	0,03
Zawiesina (eppendorf) Virus suspension (eppendorf)	y = - 0,036x + 6,16	171,1	0,04

W cyklu 5., który charakteryzował się najwyższą temperaturą biomasy zaobserwowano znacznie szybszą inaktywację parwowirusów w porównaniu z 2. cyklem kompostowania. Po 3 dobach nie stwierdzono w próbkach aktywnych wirusów i taki stan utrzymał się do końca doświadczenia (tab. 32).

Tabela 32. Średnie miana wirusa BPV [logTCID$_{50}$/ml] w różnych nośnikach w 5. cyklu kompostowania

Table 32. Mean titres of BPV [logTCID$_{50}$/ml] in different carriers in cycle 5 of composting

Typ nośnika Type of carrier	t_{max}	Czas [godz.] Time [h]			
		0	72	102	126
Mięso mielone (filtr) Minced meat (filter)	68,1°C	5,8	nw nd	nw nd	nw nd
Trzon kości (filtr) Femoral shaft (filter)			nw nd	nw nd	nw nd
Zawiesina (eppendorf) Virus suspension (eppendorf)			nw nd	nw nd	nw nd

nw – nie wykryto, nd – not detected

WIRUSY CHOROBY AUJESZKY'EGO (chA)

Wirusy choroby Aujeszky'ego z racji mniejszej, w porównaniu z parwowirusami, oporności na podwyższoną temperaturę analizowano tylko w cyklu 2. Nawet w tym przypadku okazało się, że temperatura była zbyt wysoka dla ich przeżycia. Po 72 godzinach procesu nie wykrywano aktywnych wirusów w badanych nośnikach (Tab. 33).

Tabela 33. Średnie miana wirusa choroby Aujeszky'ego [logTCID$_{50}$·ml^{-1}] w różnych nośnikach w cyklu 2. kompostowania

Table 33. Mean titres of Aujeszky disease virus [logTCID$_{50}$·ml^{-1}] in different carriers in cycle 2 of composting

Typ nośnika Type of carrier	t_{max}	Czas [godz.] Time [h]			
		0	72	102	126
Mięso mielone (filtr) Minced meat (filter)	57,2°C	3,55	nw nd	nw nd	nw nd
Trzon kości (filtr) Femoral shaft (filter)			nw nd	nw nd	nw nd
Zawiesina (eppendorf) Virus suspension (eppendorf)			nw nd	nw nd	nw nd

nw – nie wykryto, nd – not detected

4.2. FERMENTACJA W WARUNKACH MEZOFILNYCH

Cykl 1. fermentacji w warunkach mezofilnych

Próbki do analiz mikrobiologicznych wyjmowano z wnętrza reaktora po 7, 18, 25 i 28 dniach od rozpoczęcia doświadczenia. Pałeczki *E. coli* wykryto w nośnikach mięsnych po raz ostatni w 7. dniu fermentacji, o 11 dni dłużej przeżywały one natomiast w trzonie kości (tab. 34). W kolejnych czasach analiz nie wyizolowano bakterii z żadnego nośnika.

Tabela 34. Liczba pałeczek *E. coli* [NPL·g^{-1} lub NPL·ml^{-1}] w różnych nośnikach w trakcie fermentacji mezofilnej (cykl 1)

Table 34. The number of *E. coli* [MPN·g^{-1} or MPN·ml^{-1}] in different carriers during mesophilic fermentation (cycle 1)

Typ nośnika Type of carrier	Czas [dni] Time [days]				
	0	7	18	25	28
Mięso mielone Minced meat	$1{,}4 \cdot 10^{8}$	$2{,}5 \cdot 10^{2}$	nw nd	nw nd	nw nd
Mały nośnik mięsny Small meat carrier	$1{,}4 \cdot 10^{8}$	$0{,}7 \cdot 10^{2}$	nw nd	nw nd	nw nd
Duży nośnik mięsny Big meat carrier	$1{,}4 \cdot 10^{8}$	$9{,}5 \cdot 10^{6}$	nw nd	nw nd	nw nd
Trzon kości Femoral shaft	$1{,}4 \cdot 10^{8}$	$2{,}5 \cdot 10^{8}$	$0{,}7 \cdot 10^{2}$	nw nd	nw nd

nw – nie wykryto, nd – not detected

Pałeczki *Salmonella* Senftenberg W_{775} izolowano tylko w pierwszym analizowanym czasie doświadczenia. Liczba bakterii najszybciej zmniejszyła się w małym nośniku mięsnym – o 6 cykli log, a najwolniej w trzonie kości – o 3 cykle log (tab. 35).

Tabela 35. Liczba pałeczek *Salmonella* [NPL·g^{-1} lub NPL·ml^{-1}] w różnych nośnikach w trakcie fermentacji mezofilnej (cykl 1)
Table 35. The number of *Salmonella* [MPN·g^{-1} lub MPN·ml^{-1}] in different carriers during mesophilic fermentation (cycle 1)

Typ nośnika Type of carrier	Czas [dni] Time [days]				
	0	7	18	25	28
Mięso mielone Minced meat	$1{,}4\cdot10^{8}$	$9{,}5\cdot10^{3}$	nw nd	nw nd	nw nd
Mały nośnik mięsny Small meat carrier	$1{,}4\cdot10^{8}$	$0{,}9\cdot10^{2}$	nw nd	nw nd	nw nd
Duży nośnik mięsny Big meat carrier	$1{,}4\cdot10^{8}$	$7{,}5\cdot10^{4}$	nw nd	nw nd	nw nd
Trzon kości Femoral shaft	$1{,}4\cdot10^{8}$	$4{,}0\cdot10^{5}$	nw nd	nw nd	nw nd

nw – nie wykryto, nd – not detected

Paciorkowce wykryto we wszystkich badanych próbkach, nawet po 28 dniach (tab. 36). Doszło jednak do znacznej redukcji ich liczby (o 5-6 cykli log) w ostatnim terminie w porównaniu z kontrolą. Po 28 dniach najmniejszą liczbę bakterii stwierdzono w mięsie mielonym. Najdłuższy całkowity czas przeżywania (70 dni) wystąpił dla bakterii wprowadzonych do dużego nośnika mięsnego, a najkrótszy – dla bakterii w trzonie kości (43,5 dnia). Spadek liczby bakterii w trakcie trwania procesu oscylował w granicach 0,12-0,2 log/dobę (tab. 37).

Tabela 36. Liczba paciorkowców [NPL·g^{-1} lub NPL·ml^{-1}] w różnych nośnikach w trakcie fermentacji mezofilnej (cykl 1)
Table 36. The number of streptococci [MPN·g^{-1} or MPN·ml^{-1}] in different carriers during mesophilic fermentation (cycle 1)

Typ nośnika Type of carrier	Czas [dni] Time [days]				
	0	7	18	25	28
Mięso mielone Minced meat	$1{,}4\cdot10^{8}$	$2{,}5\cdot10^{5}$	$4{,}5\cdot10^{3}$	$1{,}5\cdot10^{5}$	$2{,}5\cdot10^{2}$
Mały nośnik mięsny Small meat carrier	$1{,}4\cdot10^{8}$	$1{,}4\cdot10^{9}$	$4{,}5\cdot10^{5}$	$1{,}5\cdot10^{4}$	$2{,}0\cdot10^{3}$
Duży nośnik mięsny Big meat carrier	$1{,}4\cdot10^{8}$	$1{,}5\cdot10^{7}$	$2{,}0\cdot10^{4}$	$9{,}5\cdot10^{6}$	$3{,}0\cdot10^{3}$
Trzon kości Femoral shaft	$1{,}4\cdot10^{8}$	$1{,}5\cdot10^{8}$	$1{,}4\cdot10^{5}$	$4{,}5\cdot10^{3}$	$9{,}5\cdot10^{2}$

Tabela 37. Proste regresji opisujące tempo inaktywacji paciorkowców w trakcie fermentacji mezofilnej (cykl 1)
Table 37. Regression line equations describing the inactivation rate of streptococci during mesophilic fermentation (cycle 1)

Typ nośnika Type of carrier	Równanie regresji Regression equations	Całkowity czas przeżywania [dni] Total survival time [days]	Spadek liczby bakterii [log·dzień$^{-1}$] Fall of bacteria number [log·day^{-1}]
Mięso mielone Minced meat	y = - 0,12 x + 6,80	55,65	0,12
Mały nośnik mięsny Small meat carrier	y = - 0,20 x + 9,18	46,31	0,20
Duży nośnik mięsny Big meat carrier	y = - 0,12 x + 7,94	70,03	0,12
Trzon kości Femoral shaft	y = - 0,20 x + 8,76	43,52	0,20

Przeżywalność jaj *Ascaris suum* po 7 i 18 dniach była mniejsza od 1%. W późniejszych terminach nie wykryto żywych jaj pasożyta (tab. 38).

Tabela 38. Średni odsetek jaj inwazyjnych *Ascaris suum w* trakcie fermentacji mezofilnej (cykl 1)
Table 38. Mean percentage of invasive eggs of *Ascaris suum* during mesophilic fermentation (cycle 1)

	Czas [dni] Time [days]				
	0	7	18	25	28
Średni odsetek jaj inwazyjnych Mean percentage of invasive eggs	96	<1	<1	0	0

Cykl 2. fermentacji w warunkach mezofilnych

W cyklu tym analizy bakteriologiczne i parazytologiczne dokonywane były po 7, 14 i 21 dniach procesu. Pałeczki *E. coli* podlegały szybkiej eliminacji szczególnie w nośniku kostnym (tab. 39). W 7. dniu procesu wyizolowano je tylko z nośników mięsnych. Ich liczba zmniejszyła się o 6 cykli log w mięsie mielonym i małym nośniku mięsnym, a o 4 cykle log w dużym nośniku mięsnym. Po 14 dniach nastąpiła pełna inaktywacja badanych drobnoustrojów we wszystkich nośnikach.

Tabela 39. Liczba pałeczek *E. coli* [NPL·g^{-1} lub NPL·ml^{-1}] w różnych nośnikach w trakcie fermentacji mezofilnej (cykl 2)
Table 39. The number of *E. coli* [MPN·g^{-1} or MPN·ml^{-1}] in different carriers during mesophilic fermentation (cycle 2)

Typ nośnika Type of carrier	Czas [dni] Time [days]			
	0	7	14	21
Mięso mielone Minced meat	$1{,}4 \cdot 10^8$	$0{,}9 \cdot 10^2$	nw nd	nw nd
Mały nośnik mięsny Small meat carrier	$1{,}4 \cdot 10^8$	$2{,}5 \cdot 10^2$	nw nd	nw nd
Duży nośnik mięsny Big meat carrier	$1{,}4 \cdot 10^8$	$2{,}5 \cdot 10^4$	nw nd	nw nd
Trzon kości Femoral shaft	$1{,}4 \cdot 10^8$	nw nd	nw nd	nw nd

nw – nie wykryto, nd – not detected

Pałeczki *Salmonella* uległy redukcji na poziomie 4-6 cykli log już w 7. dniu procesu we wszystkich nośnikach mięsnych. Przed upływem tego terminu zginęły w trzonie kości. Na początku drugiego tygodnia analiz nie wyizolowano bakterii z żadnego nośnika (tab. 40).

Tabela 40. Liczba pałeczek *Salmonella* [NPL·g^{-1} lub NPL·ml^{-1}] w różnych nośnikach w trakcie fermentacji mezofilnej (cykl 2)
Table 40. The number of *Salmonella* [MPN·g^{-1} or MPN·ml^{-1}] in different carriers during mesophilic fermentation (cycle 2)

Typ nośnika Type of carrier	Czas [dni] Time [days]			
	0	7	14	21
Mięso mielone Minced meat	$1{,}4 \cdot 10^8$	$1{,}5 \cdot 10^4$	nw nd	nw nd
Mały nośnik mięsny Small meat carrier	$1{,}4 \cdot 10^8$	$4{,}0 \cdot 10^2$	nw nd	nw nd
Duży nośnik mięsny Big meat carrier	$1{,}4 \cdot 10^8$	nw nd	nw nd	nw nd
Trzon kości Femoral shaft	$1{,}4 \cdot 10^8$	$2{,}5 \cdot 10^4$	nw nd	nw nd

nw – nie wykryto, nd – not detected

Znacznie większą odporność na warunki fermentacji beztlenowej wykazywały paciorkowce, gdyż były izolowane jako jedyne spośród wszystkich badanych bakterii, jeszcze w ostatnim terminie, po 21 dniach trwania doświadczenia. Najwyższy spadek ich liczby (o 6 log) nastąpił w nośniku o najwyższym stopniu rozdrobnienia, najwolniejszy – w nośniku kostnym (o 3 log), (tab. 41).

Z analizy statystycznej wynika, że najdłuższy całkowity czas przeżywania wykazywały bakterie w nośniku kostnym – 46,65 dni. Najkrótszy czas przeżywania (26,34 dni), a zarazem najszybszy dobowy spadek liczby bakterii (0,29 log/dzień) stwierdzono w mięsie mielonym (tab. 42).

Tabela 41. Liczba paciorkowców [NPL·g^{-1} lub NPL·ml^{-1}] w różnych nośnikach w trakcie fermentacji mezofilnej (cykl 2)
Table 41. The number of streptococci [MPN·g^{-1} or MPN·ml^{-1}] in different carriers during mesophilic fermentation (cycle 2)

Typ nośnika Type of carrier	Czas [dni] Time [days]			
	0	7	14	21
Mięso mielone Minced meat	$1,4 \cdot 10^8$	$9,5 \cdot 10^4$	$2,5 \cdot 10^3$	$0,9 \cdot 10^2$
Mały nośnik mięsny Small meat carrier	$1,4 \cdot 10^8$	$2,5 \cdot 10^8$	$2,0 \cdot 10^7$	$4,5 \cdot 10^3$
Duży nośnik mięsny Big meat carrier	$1,4 \cdot 10^8$	$4,5 \cdot 10^8$	$9,5 \cdot 10^4$	$1,5 \cdot 10^3$
Trzon kości Femoral shaft	$1,4 \cdot 10^8$	$1,1 \cdot 10^7$	$2,5 \cdot 10^4$	$1,5 \cdot 10^5$

Tabela 42. Proste regresji opisujące tempo inaktywacji paciorkowców w trakcie fermentacji mezofilnej (cykl 2)
Table 42. Regression line equations describing the inactivation rate of streptococci during mesophilic fermentation (cycle 2)

Typ nośnika Type of carrier	Równanie regresji Regression equations	Całkowity czas przeżywania [dni] Total survival time [days]	Spadek liczby bakterii [log/dzień] Fall of bacteria number [log/day]
Mięso mielone Minced meat	y = - 0,29 x + 7,64	26,34	0,29
Mały nośnik mięsny Small meat carrier	y = - 0,2 x + 9,06	45,3	0,2
Duży nośnik mięsny Big meat carrier	y = - 0,27 x + 9,03	33,44	0,27
Trzon kości Femoral shaft	y = - 0,17x + 7,93	46,65	0,17

Warunki panujące w bioreaktorze przyczyniły się do skutecznej eliminacji jaj *Ascaris suum*, gdyż już w pierwszej pobranej do badań próbce stwierdzono zaledwie 1% jaj inwazyjnych. W kolejnych próbkach nie wykryto żywych jaj pasożyta (tab. 43).

Tabela 43. Średni odsetek jaj inwazyjnych *Ascaris suum* w trakcie fermentacji mezofilnej (cykl 2)
Table 43. Mean percentage of invasive eggs of *Ascaris sum* during mesophilic fermentation (cycle 2)

	Czas [dni] Time [days]			
	0	7	14	21
Średni odsetek jaj inwazyjnych Mean percentage of invasive eggs	96	1	0	0

Wyniki badań wirusologicznych przeprowadzonych w trakcie fermentacji mezofilnej

WIRUSY CHOROBY AUJESZKY'EGO (chA)

Badania wirusologiczne wskazują, że miano wirusów choroby Aujeszky'ego (będących w postaci zawiesiny w eppendorfie) stopniowo malało w trakcie procesu fermentacji mezofilnej. Po 6 dniach doszło do inaktywacji wirusa. Całkowity czas jego przeżywania wyliczono na ok. 13 godz., a spadek – na 0,26 log·godz.$^{-1}$ (tab. 44).

Tabela 44. Średnie miana wirusa choroby Aujeszky'ego [logTCID$_{50}$·ml^{-1}] w trakcie fermentacji mezofilnej oraz prosta regresji (cykl 2)
Table 44. Mean titres of Aujeszky disease virus [logTCID$_{50}$·ml^{-1}] and regression line equations during mesophilic fermentation (cycle 2)

Czas [godz.] Time [h]	Miano [logTCID$_{50}$·ml^{-1}] Titre [logTCID$_{50}$·ml^{-1}]	Równanie regresji Regression equations
0	3,55	y = -0,26x + 3,42 x = 13,15 godz. – całkowity czas przeżywania, total survival time [h]; 0,26 log·godz.$^{-1}$ – spadek miana wirusa, fall of titer [log·h^{-1}]
1	3,05	
2	2,8	
4	2,55	
5	2,05	
6	nw nd	
10	nw nd	

nw – nie wykryto, nd – not detected

BYDLĘCE PARWOWIRUSY (BPV)

Próbki wirusa w postaci zawiesiny w eppendorfach analizowane były co tydzień w ciągu miesiąca. Okazało się, że w tym czasie doszło do spadku miana o ok. 2 log $TCID_{50}$, co daje średni dobowy spadek 0,085 cykli log (tab. 45).

Tabela 45. Średnie miana wirusa BPV [$logTCID_{50} \cdot ml^{-1}$] w czasie fermentacji mezofilnej oraz prosta regresji (cykl 2)

Table 45. Mean titres of BPV [$logTCID_{50} \cdot ml^{-1}$] and regression line equations during mesophilic fermentation (cycle 2)

Czas [dni] Time [days]	Miano [$logTCID_{50} \cdot ml^{-1}$] Titre [$logTCID_{50} \cdot ml^{-1}$]	Równanie regresji Regression equations
0	5,8	y = -0,085x + 5,9 x = 69,4 dni – całkowity czas przeżywania, total survival time [days]; 0,085 log/dzień – spadek miana wirusa, fall of titer [log/day]
7	5,55	
14	4,55	
21	4,05	
28	3,55	

4.3. FERMENTACJA W WARUNKACH TERMOFILNYCH

Przeprowadzono 3 cykle doświadczalne, w których temperatura w bioreaktorze utrzymywała się na stałym poziomie 55°C.

Cykl 1. fermentacji w warunkach termofilnych

Liczbę bakterii i żywych jaj *Ascaris suum* analizowano w trakcie procesu czterokrotnie – po 6, 12, 24 i 36 godzinach.

Całkowita inaktywacja pałeczek *E. coli* nastąpiła we wszystkich typach nośników między 12. a 24. godziną procesu (tab. 46). Po 12 godzinach najwięcej bakterii przeżyło w mięsie mielonym, natomiast w nośniku kostnym zginęły one najszybciej. W trzonie kości ostatni raz izolowano bakterie po 6 godzinach. Z analizy statystycznej wynika, że najdłuższy całkowity czas przeżywania pałeczek wynosił 31,4 godziny w mięsie mielonym. Spadek liczby *E. coli* wahał się w granicach od 0,18 do 0,25 $log \cdot godz.^{-1}$ (tab. 47).

Tabela 46. Liczba pałeczek *E. coli* [NPL·g^{-1} lub NPL·ml^{-1}] w różnych nośnikach w trakcie fermentacji termofilnej (cykl 1)
Table 46. The number of *E. coli* [MPN·g^{-1} or MPN·ml^{-1}] in different carriers during thermophilic fermentation (cycle 1)

Typ nośnika Type of carrier	Czas [godz.] Time [h]				
	0	6	12	24	36
Mięso mielone Minced meat	$1{,}4 \cdot 10^8$	$1{,}5 \cdot 10^7$	$1{,}5 \cdot 10^4$	nw nd	nw nd
Mały nośnik mięsny Small meat carrier	$1{,}4 \cdot 10^8$	$0{,}9 \cdot 10^2$	$0{,}4 \cdot 10^2$	nw nd	nw nd
Duży nośnik mięsny Big meat carrier	$1{,}4 \cdot 10^8$	$9{,}5 \cdot 10^3$	$4{,}5 \cdot 10^2$	nw nd	nw nd
Trzon kości Femoral shaft	$1{,}4 \cdot 10^8$	$7{,}5 \cdot 10^2$	nw nd	nw nd	nw nd

nw – nie wykryto, nd – not detected

Tabela 47. Proste regresji opisujące tempo inaktywacji pałeczek *E. coli* w trakcie fermentacji termofilnej (cykl 1)
Table 47. Regression line equations describing the inactivation rate of *E. coli* during thermophilic fermentation (cycle 1)

Typ nośnika Type of carrier	Równanie regresji Regression equations	Całkowity czas przeżywania [godz.] Total survival time [h]	Spadek liczby bakterii [log·godz.$^{-1}$] Fall of bacteria number [log·h^{-1}]
Mięso mielone Minced meat	y = - 0,25 x + 7,84	31,4	0,25
Mały nośnik mięsny Small meat carrier	y = - 0,18 x + 5,17	29,0	0,18
Duży nośnik mięsny Big meat carrier	y = - 0,21 x + 6,22	31,0	0,21
Trzon kości Femoral shaft	nw po 12 godz. nd after 12 h	-	-

nw – nie wykryto, not detected

Podobnie jak w przypadku pałeczek okrężnicy, bakterie *Salmonella* Senftenberg W_{775} wykrywano po raz ostatni w 12. godzinie procesu. Do najszybszej redukcji ich liczby doszło w trzonie kości i małym nośniku mięsnym – w ciągu 6 godzin spadła ona o 6 cykli log. Analiza wykonana po 24 godzinach wykazała całkowitą eliminację bakterii we wszystkich typach nośników (tab. 48). Jak wynika z tabeli 49 najdłuższy czas przeżywania pałeczek *Salmonella* stwierdzono w najbardziej rozdrobnionym nośniku mięsnym – wynosił on prawie 32 godziny. Nieco wolniej pałeczki inaktywowane były w dużym nośni-

ku mięsnym, natomiast najkrócej przeżyły w trzonie kości i małym nośniku mięsnym.

Tabela 48. Liczba pałeczek *Salmonella* [NPL·g^{-1} lub NPL·ml^{-1}] w różnych nośnikach w trakcie fermentacji termofilnej (cykl 1)
Table 48. The number of *Salmonella* [MPN·g^{-1} or MPN·ml^{-1}] in different carriers during thermophilic fermentation (cycle 1)

Typ nośnika Type of carrier	Czas [godz.] Time [h]				
	0	6	12	24	36
Mięso mielone Minced meat	$1{,}4 \cdot 10^8$	$9{,}5 \cdot 10^6$	$9{,}5 \cdot 10^4$	nw nd	nw nd
Mały nośnik mięsny Small meat carrier	$1{,}4 \cdot 10^8$	$2{,}5 \cdot 10^2$	nw nd	nw nd	nw nd
Duży nośnik mięsny Big meat carrier	$1{,}4 \cdot 10^8$	$2{,}5 \cdot 10^4$	nw nd	nw nd	nw nd
Trzon kości Femoral shaft	$1{,}4 \cdot 10^8$	$0{,}7 \cdot 10^2$	nw nd	nw nd	nw nd

nw – nie wykryto, nd – not detected

Tabela 49. Proste regresji opisujące tempo inaktywacji pałeczek *Salmonella* w trakcie fermentacji termofilnej (cykl 1)
Table 49. Regression line equations describing the inactivation rate of *Salmonella* during thermophilic fermentation (cycle 1)

Typ nośnika Type of carrier	Równanie regresji Regression equations	Całkowity czas przeżywania [godz.] Total survival time [h]	Spadek liczby bakterii [log·h^{-1}] Fall of bacteria number [log·h^{-1}]
Mięso mielone Minced meat	y = - 0,25 x + 7,98	31,92	0,25
Mały nośnik mięsny Small meat carrier	nw po 12 godz. nd after 12 h	-	-
Duży nośnik mięsny Big meat carrier	y = - 0,21 x + 6,37	30,33	0,21
Trzon kości Femoral shaft	nw po 12 godz. nd after 12 h	-	-

nw – nie wykryto, nd – not detected

Paciorkowce wykazywały największą oporność na temperaturę oraz warunki fermentacji spośród wszystkich badanych bakterii. Liczba ich spadała najwolniej w małym nośniku mięsnym i w kości. Po 24 godzinach stwierdzono redukcję ich liczby o 6 cykli log. Bakterie najszybciej zginęły w dużej kostce mięsa. Nie wyizolowano ich już w 12. godzinie doświadczenia. Całkowita inaktywacja nastąpiła we wszystkich typach nośników po 36 godzinach procesu.

Z analizy statystycznej wynika, że całkowity czas przeżywania paciorkowców i spadek ich liczby w trzech nośnikach był podobny i wynosił odpowiednio: około 32 godzin i około 0,2 log·godz.$^{-1}$ (tab. 50, 51).

Tabela 50. Liczba paciorkowców [NPL·g^{-1} lub NPL·ml^{-1}] w różnych nośnikach w trakcie fermentacji termofilnej (cykl 1)
Table 50. The number of streptococci [MPN·g^{-1} or MPN·ml^{-1}] in different carriers during thermophilic fermentation (cycle 1)

Typ nośnika Type of carrier	Czas [godz.] Time [h]				
	0	6	12	24	36
Mięso mielone Minced meat	$1{,}4\cdot10^{8}$	$4{,}5\cdot10^{4}$	$2{,}5\cdot10^{4}$	nw nd	nw nd
Mały nośnik mięsny Small meat carrier	$1{,}4\cdot10^{8}$	$2{,}0\cdot10^{7}$	$0{,}9\cdot10^{2}$	$0{,}4\cdot10^{2}$	nw nd
Duży nośnik mięsny Big meat carrier	$1{,}4\cdot10^{8}$	$4{,}5\cdot10^{3}$	nw nd	nw nd	nw nd
Trzon kości Femoral shaft	$1{,}4\cdot10^{8}$	$1{,}5\cdot10^{5}$	nw nd	$0{,}4\cdot10^{2}$	nw nd

nw – nie wykryto, nd – not detected

Tabela 51. Proste regresji opisujące tempo inaktywacji paciorkowców w trakcie fermentacji termofilnej (cykl 1)
Table 51. Regression line equations describing the inactivation rate of streptococci during thermophilic fermentation (cycle 1)

Typ nośnika Type of carrier	Równanie regresji Regression equations	Całkowity czas przeżywania [godz.] Total survival time [h]	Spadek liczby bakterii [log·godz.$^{-1}$] Fall of bacteria number [log·h^{-1}]
Mięso mielone Minced meat	y = -0,22 x + 6,94	31,5	0,22
Mały nośnik mięsny Small meat carrier	y = -0,23 x + 7,36	32,0	0,23
Duży nośnik mięsny Big meat carrier	nw po 12 godz. nd after 12 h	-	-
Trzon kości Femoral shaft	y = -0,2 x + 6,04	32,0	0,20

nw – nie wykryto, nd – not detected

Cykl 2. fermentacji w warunkach termofilnych

Próbki do badań pobierano w 6., 12., 18. i 40. godzinie od momentu rozpoczęcia doświadczenia. Tempo inaktywacji pałeczek *E. coli* uzależnione było od typu nośnika. Jak wynika z tabeli 52 już po 12 godzinach nie wyizolowano bakterii z mięsa mielonego, natomiast w pozostałych nośnikach ich liczba spadła o 5-7 log. Najwięcej bakterii w tym terminie pozostało w dużym nośniku mięsnym, a najmniej w nośniku kostnym. W 18. godzinie procesu uzyskano inaktywację badanych drobnoustrojów we wszystkich typach nośników. Analiza statystyczna pozwoliła określić całkowity czas przeżywania bakterii w poszczególnych nośnikach. Był on dość wyrównany i wahał się od 31,15 w nośniku kostnym do 33,94 w dużym nośniku mięsnym (tab. 53).

Tabela 52. Liczba pałeczek *E. coli* [NPL·g^{-1} lub NPL·ml^{-1}] w różnych nośnikach w trakcie fermentacji termofilnej (cykl 2)

Table 52. The number of *E. coli* [MPN·g^{-1} or MPN·ml^{-1}] in different carriers during thermophilic fermentation (cycle 2)

Typ nośnika Type of carrier	Czas [godz.] Time [h]				
	0	6	12	18	40
Mięso mielone Minced meat	$1{,}4\cdot10^{9}$	$9{,}5\cdot10^{3}$	nw nd	nw nd	nw nd
Mały nośnik mięsny Small meat carrier	$1{,}4\cdot10^{9}$	$1{,}4\cdot10^{9}$	$3{,}0\cdot10^{3}$	nw nd	nw nd
Duży nośnik mięsny Big meat carrier	$1{,}4\cdot10^{9}$	$3{,}0\cdot10^{7}$	$9{,}5\cdot10^{4}$	nw nd	nw nd
Trzon kości Femoral shaft	$1{,}4\cdot10^{9}$	$9{,}5\cdot10^{2}$	$1{,}5\cdot10^{2}$	nw nd	nw nd

nw – nie wykryto, nd – not detected

Tabela 53. Proste regresji opisujące tempo inaktywacji pałeczek *E. coli* w trakcie fermentacji termofilnej (cykl 2)

Table 53. Regression line equations describing the inactivation rate of *E. coli* during thermophilic fermentation (cycle 2)

Typ nośnika Type of carrier	Równanie regresji Regression equations	Całkowity czas przeżywania [godz.] Total survival time [h]	Spadek liczby bakterii [log·godz.$^{-1}$] Fall of bacteria number [log·h^{-1}]
Mały nośnik mięsny Small meat carrier	y = - 0,23 x + 7,66	31,19	0,23
Duży nośnik mięsny Big meat carrier	y = - 0,22 x + 7,46	33,94	0,22
Trzon kości Femoral shaft	y = - 0,17 x + 5,19	31,15	0,17

Paciorkowce kałowe najszybciej eliminowane były w mięsie mielonym, bowiem nie wyizolowano ich już po 18 godzinach procesu (tab. 54). W tym czasie liczba bakterii w pozostałych nośnikach spadła o 7 log. Nie stwierdzono ich obecności w żadnej próbce po 40 godzinach doświadczenia. Jak wynika z wyliczeń statystycznych spadek populacji paciorkowców we wszystkich nośnikach był bardzo zbliżony i wynosił 0,18-0,22 log·godz.$^{-1}$ (tab. 55).

Tabela 54. Liczba paciorkowców [NPL·g^{-1} lub NPL·ml^{-1}] w różnych nośnikach w trakcie fermentacji termofilnej (cykl 2)
Table 54. The number of streptococci [MPN·g^{-1} or MPN·ml^{-1}] in different carriers during thermophilic fermentation (cycle 2)

Typ nośnika Type of carrier	Czas [godz.] Time [h]				
	0	6	12	18	40
Mięso mielone Minced meat	$1{,}4\cdot10^{9}$	$4{,}5\cdot10^{5}$	$0{,}9\cdot10^{2}$	nw nd	nw nd
Mały nośnik mięsny Small meat carrier	$1{,}4\cdot10^{9}$	$1{,}5\cdot10^{5}$	$4{,}5\cdot10^{3}$	$0{,}4\cdot10^{2}$	nw nd
Duży nośnik mięsny Big meat carrier	$1{,}4\cdot10^{9}$	$9{,}5\cdot10^{4}$	$0{,}4\cdot10^{2}$	$0{,}9\cdot10^{2}$	nw nd
Trzon kości Femoral shaft	$1{,}4\cdot10^{9}$	$9{,}5\cdot10^{7}$	$1{,}5\cdot10^{6}$	$2{,}5\cdot10^{2}$	nw nd

nw – nie wykryto, nd – not detected

Tabela 55. Proste regresji opisujące tempo inaktywacji paciorkowców w trakcie fermentacji termofilnej (cykl 2)
Table 55. Regression line equations describing the inactivation rate of streptococci during thermophilic fermentation (cycle 2)

Typ nośnika Type of carrier	Równanie regresji Regression equations	Całkowity czas przeżywania [godz.] Total survival time [h]	Spadek liczby bakterii [log·godz.$^{-1}$] Fall of bacteria number [log·h^{-1}]
Mięso mielone Minced meat	y = - 0,19 x + 6,07	31,61	0,19
Mały nośnik mięsny Small meat carrier	y = - 0,19 x + 6,57	34,93	0,19
Duży nośnik mięsny Big meat carrier	y = - 0,18 x + 6,04	33,89	0,18
Trzon kości Femoral shaft	y = - 0,22 x + 8,31	37,49	0,22

Spośród badanych bakterii najszybciej w warunkach termofilnych ginęły pałeczki *Salmonella* Senftenberg W_{775}. Po 12 godzinach procesu fermentacji w warunkach termofilnych nie wyizolowano ich z żadnego nośnika (tab. 56).

Tabela 56. Liczba pałeczek *Salmonella* [NPL·g^{-1} lub NPL·ml^{-1}] w różnych nośnikach w trakcie fermentacji termofilnej (cykl 2)
Table 56. The number of *Salmonella* [MPN·g^{-1} or MPN·ml^{-1}] in different carriers during thermophilic fermentation (cycle 2)

Typ nośnika Type of carrier	Czas [godz.] Time [h]				
	0	6	12	18	40
Mięso mielone Minced meat	$1{,}4 \cdot 10^9$	$2{,}5 \cdot 10^3$	nw nd	$1{,}4 \cdot 10^2$	nw nd
Mały nośnik mięsny Small meat carrier	$1{,}4 \cdot 10^9$	$4{,}5 \cdot 10^6$	nw nd	nw nd	nw nd
Duży nośnik mięsny Big meat carrier	$1{,}4 \cdot 10^9$	$4{,}5 \cdot 10^5$	nw nd	nw nd	nw nd
Trzon kości Femoral shaft	$1{,}4 \cdot 10^9$	$4{,}5 \cdot 10^5$	nw nd	nw nd	nw nd

nw – nie wykryto, nd – not detected

Wyniki badań parazytologicznych przedstawiono w tabeli 57. Już w ciągu pierwszych sześciu godzin odsetek żywych jaj spadł do 2%. Pełną inaktywację uzyskano w 18. godzinie trwania procesu. Całkowity czas przeżycia jaj *Ascaris suum* wynosił około 10 godzin.

Tabela 57. Średni odsetek jaj inwazyjnych *Ascaris suum* w trakcie fermentacji termofilnej i prosta regresji (cykl 2)
Table 57. Mean percentage of invasive eggs of *Ascaris suum* during thermophilic fermentation (cycle 2)

Czas [godz.] Time [h]	Średni odsetek jaj inwazyjnych Mean percentage of invasive eggs	Równanie regresji Regression equations
0	96	y = -7,92x + 80,50 x = 10,16 godz. – całkowity czas przeżywania; total survival time [h] 7,92%·godz.$^{-1}$ – spadek odsetka jaj żywych, fall in percentage of invasive eggs [%·h^{-1}]
6	2	
12	1	
18	0	
40	0	

Cykl 3. fermentacji w warunkach termofilnych

Pałeczki *E. coli* uległy całkowitej inaktywacji jedynie w mięsie mielonym po 12 godz., natomiast w pozostałych nośnikach redukcja ich liczby w tym samym czasie wynosiła 6 cykli log (tab. 58). Po 18 godzinach trwania procesu uzyskano pełną inaktywację bakterii we wszystkich próbkach. Analiza staty-

styczna pozwoliła określić całkowity czas przeżywania pałeczek, który wynosił ok. 24 godzin we wszystkich nośnikach (tab. 59). Spadek liczby *E. coli* w nośnikach również był zbliżony i wynosił około 0,27 log·godz.$^{-1}$.

Tabela 58. Liczba pałeczek *E. coli* [NPL·g^{-1} lub NPL·ml^{-1}] w różnych nośnikach w trakcie fermentacji termofilnej (cykl 3)
Table 58. The number of *E. coli* [MPN·g^{-1} or MPN·ml^{-1}] in different carriers during thermophilic fermentation (cycle 3)

Typ nośnika Type of carrier	Czas [godz.] Time [h]				
	0	6	12	18	30
Mięso mielone Minced meat	$2{,}5\cdot10^{8}$	$4{,}5\cdot10^{2}$	nw nd	nw nd	nw nd
Mały nośnik mięsny Small meat carrier	$2{,}5\cdot10^{8}$	$4{,}5\cdot10^{4}$	$4{,}5\cdot10^{2}$	nw nd	nw nd
Duży nośnik mięsny Big meat carrier	$2{,}5\cdot10^{8}$	$4{,}5\cdot10^{4}$	$2{,}5\cdot10^{2}$	nw nd	nw nd
Trzon kości Femoral shaft	$2{,}5\cdot10^{8}$	$4{,}5\cdot10^{4}$	$2{,}5\cdot10^{2}$	nw nd	nw nd

nw – nie wykryto, nd – not detected

Tabela 59. Proste regresji opisujące tempo inaktywacji pałeczek *E. coli*. w trakcie fermentacji termofilnej (cykl 3)
Table 59. Regression line equations describing the inactivation rate of *E. coli* during thermophilic fermentation (cycle 3)

Typ nośnika Type of carrier	Równanie regresji Regression equations	Całkowity czas przeżywania [godz.] Total survival time [h]	Spadek liczby bakterii [log·godz.$^{-1}$] Fall of bacteria number [log·h^{-1}]
Mięso mielone Minced meat	nw po 12 godz. nd after 12 h	-	-
Mały nośnik mięsny Small meat carrier	$y = -0{,}27\,x + 6{,}60$	24,45	0,27
Duży nośnik mięsny Big meat carrier	$y = -0{,}26\,x + 6{,}23$	24,26	0,26
Trzon kości Femoral shaft	$y = -0{,}27\,x + 6{,}60$	24,45	0,27

nw – nie wykryto, nd – not detected

Pałeczki *Salmonella* najkrócej przeżyły w małej kostce mięsa, nie wykryto ich już po 12 godzinach procesu fermentacji. W pozostałych nośnikach w tym samym terminie analizy nastąpił spadek ich liczebności o 6 cykli log. Inaktywację bakterii we wszystkich nośnikach uzyskano w 18. godzinie doświadczenia (tab. 60). Redukcja ich liczby w poszczególnych nośnikach była dość wyrówna-

na i wahała się od 0,29 log·godz.$^{-1}$ w dużym nośniku mięsnym do 0,32 log·godz.$^{-1}$ w mięsie mielonym (tab. 61).

Tabela 60. Liczba pałeczek *Salmonella* [NPL·g^{-1} lub NPL·ml^{-1}] w różnych nośnikach w trakcie fermentacji termofilnej (cykl 3)
Table 60. The number of *Salmonella* [MPN·g^{-1} or MPN·ml^{-1}] in different carriers during thermophilic fermentation (cycle 3)

Typ nośnika Type of carrier	Czas [godz.] Time [h]				
	0	6	12	18	30
Mięso mielone Minced meat	$2,5 \cdot 10^8$	$2,5 \cdot 10^8$	$2,5 \cdot 10^2$	nw nd	nw nd
Mały nośnik mięsny Small meat carrier	$2,5 \cdot 10^8$	$2,5 \cdot 10^7$	nw nd	nw nd	nw nd
Duży nośnik mięsny Big meat carrier	$2,5 \cdot 10^8$	$9,5 \cdot 10^5$	$0,4 \cdot 10^2$	nw nd	nw nd
Trzon kości Femoral shaft	$2,5 \cdot 10^8$	$4,5 \cdot 10^6$	$9,5 \cdot 10^2$	nw nd	nw nd

nw – nie wykryto, nd – not detected

Tabela 61. Proste regresji opisujące tempo inaktywacji pałeczek *Salmonella* w trakcie fermentacji termofilnej (cykl 3)
Table 61. Regression line equations describing the inactivation rate of *Salmonella* during thermophilic fermentation (cycle 3)

Typ nośnika Type of carrier	Równanie regresji Regression equations	Całkowity czas przeżywania [godz.] Total survival time [h]	Spadek liczby bakterii [log·godz.$^{-1}$] Fall of bacteria number [log·h^{-1}]
Mięso mielone Minced meat	y = - 0,32 x + 8,02	25,01	0,32
Mały nośnik mięsny Small meat carrier	nw po 12 godz.	-	-
Duży nośnik mięsny Big meat carrier	y = - 0,29 x + 6,92	24,20	0,29
Trzon kości Femoral shaft	y = - 0,30 x + 7,49	25,11	0,30

nw – nie wykryto, nd – not detected

Paciorkowce kałowe ponownie okazały się najbardziej oporne spośród badanych bakterii na warunki fermentacji. Najdłużej wykrywano je w mięsie mielonym. Po 18 godzinach ich liczba w tym nośniku spadła o 4 cykle log, natomiast najszybciej zginęły w małym nośniku mięsnym (nie wyizolowano ich w 18. godzinie). Większy spadek liczby bakterii (ok. 0,26 log·godz.$^{-1}$) stwier-

dzono w małych nośnikach, natomiast mniejszy – w dużym nośniku mięsnym (0,19 log·godz.$^{-1}$), (tab. 62, 63).

Tabela 62. Liczba paciorkowców [NPL·g^{-1} lub NPL·ml^{-1}] w różnych nośnikach w trakcie fermentacji termofilnej (cykl 3)
Table 62. The number of streptococci [MPN·g^{-1} or MPN·ml^{-1}] in different carriers during thermophilic fermentation (cycle 3)

Typ nośnika Type of carrier	Czas [godz.] Time [h]				
	0	6	12	18	30
Mięso mielone Minced meat	$2,5\cdot10^8$	$4,5\cdot10^6$	$1,5\cdot10^6$	$4,5\cdot10^4$	nw nd
Mały nośnik mięsny Small meat carrier	$2,5\cdot10^8$	$2,0\cdot10^5$	$2,5\cdot10^2$	nw nd	nw nd
Duży nośnik mięsny Big meat carrier	$2,5\cdot10^8$	$1,4\cdot10^4$	$0,4\cdot10^2$	nw nd	nw nd
Trzon kości Femoral shaft	$2,5\cdot10^8$	$2,0\cdot10^6$	$1,5\cdot10^6$	nw nd	nw nd

nw – nie wykryto, nd – not detected

Tabela 63. Proste regresji opisujące tempo inaktywacji paciorkowców w trakcie fermentacji termofilnej (cykl 3)
Table 63. Regression line equations describing the inactivation rate of streptococci during thermophilic fermentation (cycle 3)

Typ nośnika Type of carrier	Równanie regresji Regression equations	Całkowity czas przeżywania [godz.] Total survival time [h]	Spadek liczby bakterii [log·godz.$^{-1}$] Fall of bacteria number [log·h^{-1}]
Mięso mielone Minced meat	y = - 0,24 x + 6,39	26,20	0,24
Mały nośnik mięsny Small meat carrier	y = - 0,26 x + 6,98	26,40	0,26
Duży nośnik mięsny Big meat carrier	y = - 0,19 x + 8,08	41,70	0,19
Trzon kości Femoral shaft	y = - 0,26x + 8,60	32,64	0,26

Inaktywacja jaj *Ascaris suum w* bioreaktorze była bardzo szybka. Żywe jaja glisty obserwowano tylko po 6 godzinach (tab. 64).

Tabela 64. Średni odsetek jaj inwazyjnych *Ascaris suum* w trakcie fermentacji termofilnej (cykl 3)
Table 64. Mean percentage of invasive eggs of *Ascaris suum* during thermophilic fermentation (cycle 3)

	Czas [godz.] Time [h]				
	0	6	12	18	30
Średni odsetek jaj inwazyjnych Mean percentage of invasive eggs	96	1	0	0	0

Wyniki badań wirusologicznych przeprowadzonych w trakcie fermentacji mezofilnej

Z powodu różnej termooporności badanych wirusów w badaniach zastosowano odmienne czasy ekspozycji na temperaturę 55°C. Zawiesiny wirusów choroby Aujeszky'ego pobierano z bioreaktora w odstępach kilkuminutowych, podczas gdy termooporne parwowirusy – co kilka godzin.

WIRUSY CHOROBY AUJESZKY'EGO (chA)

Ostatnia próbka, w której zidentyfikowano obecność wirusów choroby Aujeszky'ego poddawana była działaniu temperatury biomasy przez 10 minut. Po 30 i 60 minutach nie stwierdzono w zawiesinach żywych cząstek. Całkowity czas przeżywania wirusów w tej temperaturze wyliczono na około 50 minut (tab. 65).

Tabela 65. Średnie miana wirusa choroby Aujeszky'ego [$logTCID_{50} \cdot ml^{-1}$] w trakcie fermentacji termofilnej oraz prosta regresji (cykl 3)
Table 65. Mean titres of Aujeszky disease virus [$logTCID_{50} \cdot ml^{-1}$] during thermophilic fermentation (cycle 3)

Czas [min] Time [min]	Miano [$logTCID_{50} \cdot ml^{-1}$] Titre [$logTCID_{50} \cdot ml^{-1}$]	Równanie regresji Regression equations
0	3,55	y = -0,058x + 2,92 x = 50,3 min – całkowity czas przeżywania; 0,06 log/min – spadek miana wirusa
1	2,8	
3	2,8	
6	2,05	
10	2,8	
30	-	
60	-	

BYDLĘCE PARWOWIRUSY (BPV)

W trzonie kości i dużym nośniku mięsnym spadek miana wirusa był najwolniejszy – rzędu 2 log po 24 godzinach. Najszybciej BPV inaktywowane były w zawiesinie w eppendorfie umieszczonym w biomasie (tab. 66). Całkowity czas ich przeżywania wahał się w zakresie od 46,9 do 76,0 godzin. Najkrótszy oznaczono dla zawiesiny wirusa w eppendorfie, a najdłuższy – dla wirusów w trzonie kości (tab. 67).

Tabela 66. Średnie miana wirusa BPV [$logTCID_{50} \cdot ml^{-1}$] w różnych nośnikach w czasie fermentacji termofilnej (cykl 3)
Table 66. Mean titres of BPV [$logTCID_{50} \cdot ml^{-1}$] in different carriers during thermophilic fermentation (cycle 3)

Typ nośnika Type of carrier	Czas [godz.] Time [h]				
	0	5	10	15	24
Mięso mielone Minced meat	5,8	3,55	nb ne	nb ne	3,3
Mały nośnik mięsny Small meat carrier		3,8			3,55
Duży nośnik mięsny Big meat carrier		5,3			3,8
Trzon kości Femoral shaft		4,55			3,8
eppendorf		2,8			2,55

nb – nie badano, ne – not examined

Tabela 67. Proste regresji opisujące tempo inaktywacji wirusa BPV w różnych nośnikach w trakcie fermentacji termofilnej (cykl 3)
Table. 67. Regression line equations describing the inactivation rate of BPV in different carriers during thermophilic fermentation (cycle 3)

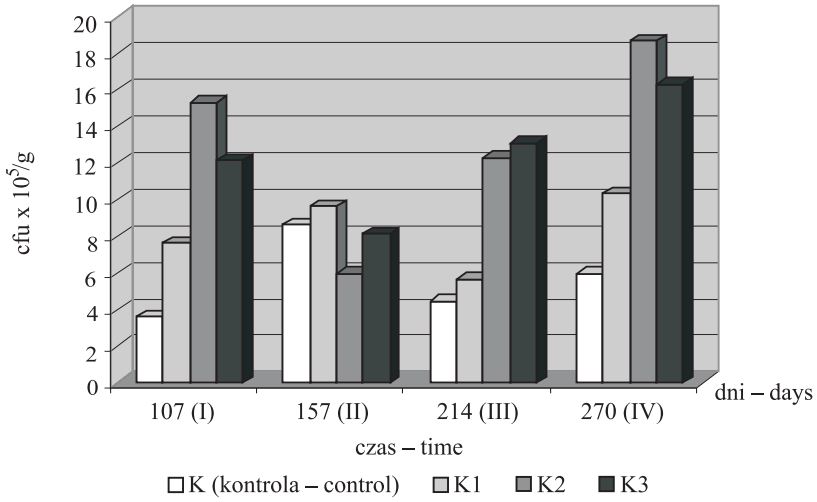
Typ nośnika Type of carrier	Równanie regresji Regression equations	Całkowity czas przeżywania [godz.] Total survival time [h]	Spadek miana wirusa [$log \cdot godz.^{-1}$] Fall of titer [$log \cdot h^{-1}$]
Mięso mielone Minced meat	y = -0,079x + 4,98	63,0	0,08
Mały nośnik mięsny Small meat carrier	y = -0,071x + 5,07	71,4	0,07
Duży nośnik mięsny Big meat carrier	y = -0,082x + 5,76	70,2	0,08
Trzon kości Femoral shaft	y = -0,071x + 5,4	76,0	0,07
eppendorf	y = -0,10x + 4,69	46,9	0,10

4.4. BADANIA MIKROBIOLOGICZNE GLEBY

Badaniom tym poddano zarówno glebę kontrolną przed dodaniem „polepszaczy" (K), jak i glebę ze wzrastającymi dawkami kompostu (K1, K2, K3) i cieczy pofermentacyjnej (F1, F2, F3). Dawki K2 i F2 są dawkami optymalnymi zalecanymi do nawożenia.

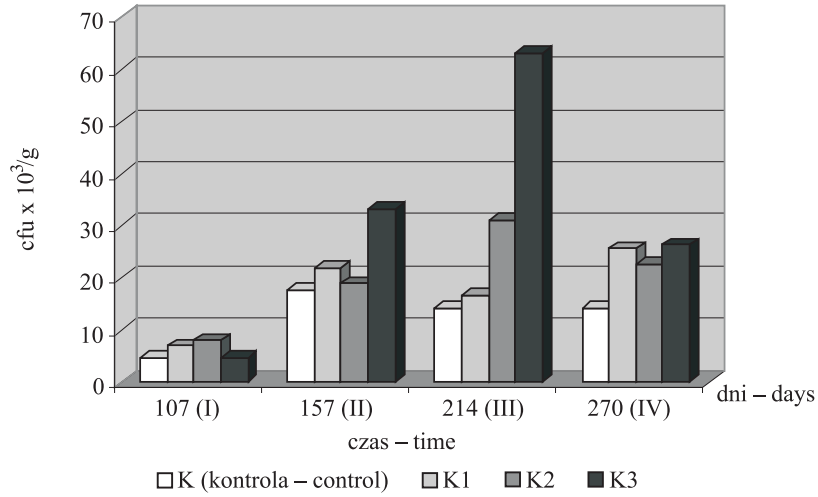
4.4.1. Gleba z dodatkiem kompostu

W przypadku nawożenia kompostem ogólna liczba bakterii glebowych nie zawsze kształtowała się proporcjonalnie do jego dawki. Nie zaobserwowano również, aby czas oddziaływania kompostu na mikroorganizmy glebowe powodował zmiany ilościowe ich populacji. Najbardziej zauważalny wpływ polepszacza na różnice w liczbie mikroorganizmów zanotowano po 107, 214 i 270 dniach. W tych terminach doszło do kilkukrotnego wzrostu populacji w porównaniu z kontrolą. Jedynie po 157 dniach liczba bakterii w każdym przypadku była zbliżona (rys. 8).



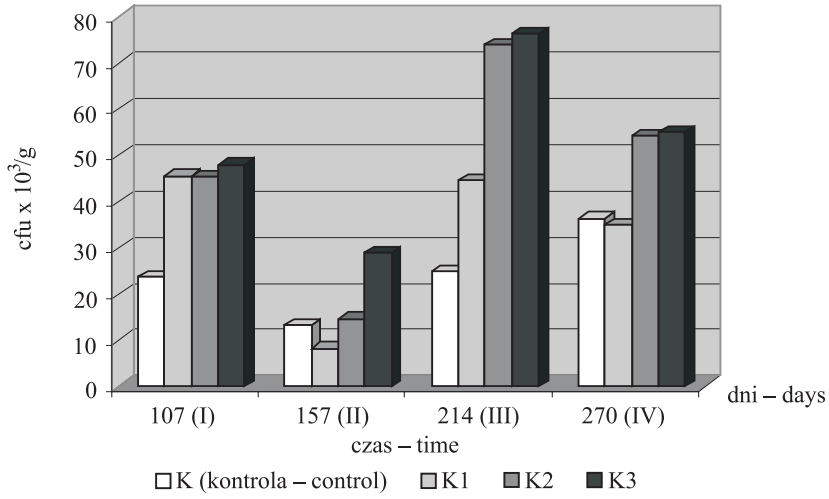
Rys. 8. Ogólna liczba bakterii w glebie z różnymi dawkami kompostu (K, K1, K2, K3)
Fig. 8. Total number of bacteria in soil with different compost doses (K, K1, K2, K3)

Liczba grzybów w porównaniu z próbką kontrolną wzrastała pod wpływem nawożenia kompostem w II, III i IV terminie badań. Jedynie na początku doświadczenia nie zaobserwowano takiego wpływu. Największy wpływ na przyrost populacji grzybów miała najwyższa dawka kompostu w trzecim terminie analiz. Spowodowała ona 6-krotny, w porównaniu z kontrolą i dawką najmniejszą (K1), wzrost liczby badanych mikroorganizmów (rys. 9). Taka tendencja nie utrzymała się do końca okresu badawczego.



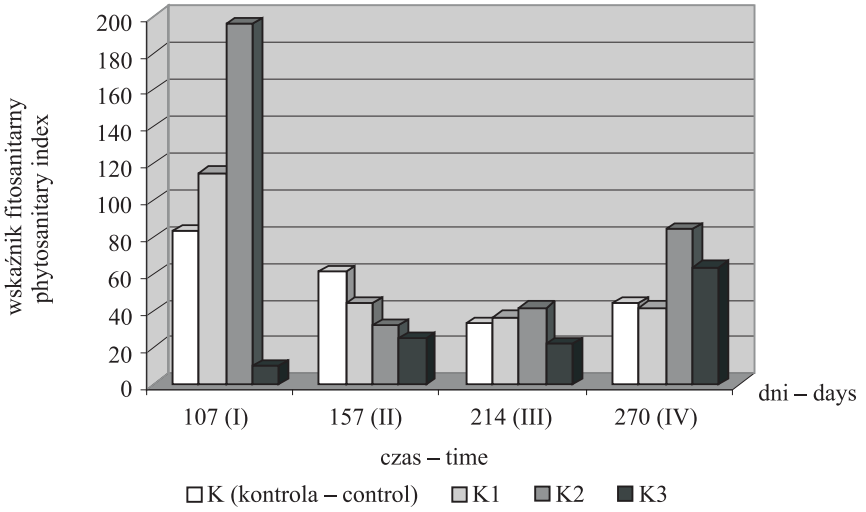
Rys. 9. Ogólna liczba grzybów w glebie z różnymi dawkami kompostu (K, K1, K2, K3)
Fig. 9. Total number of fungi in soil with different compost doses (K, K1, K2, K3)

Liczba promieniowców wzrastała w glebach wzbogaconych o kompost, zwłaszcza o wyższe jego dawki (K1, K2) w całym okresie badawczym. Najbardziej widoczne to było w III terminie analiz, w którym liczba mikroorganizmów była 3-krotnie wyższa od kontroli. Po kolejnych 2 miesiącach badań (IV termin) różnica nie była już tak widoczna, wyższe dawki „polepszacza" spowodowały 1,5-krotny przyrost populacji promieniowców w stosunku do próbki kontrolnej (rys. 10).



Rys. 10. Ogólna liczba promieniowców w glebie z różnymi dawkami kompostu (K, K1, K2, K3)
Fig. 10. Total number of actinobacteria in soil with different compost doses (K, K1, K2, K3)

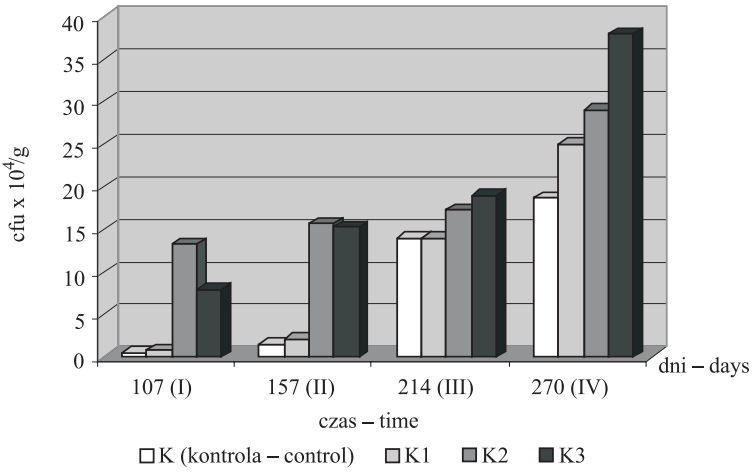
Na podstawie ogólnej liczby bakterii, grzybów i promieniowców obliczono współczynnik fitosanitarny badanych gleb (rys. 11). Większe wartości wskaźnika informują o słabszym rozwoju grzybów, natomiast mniejsze o silniejszym ich rozwoju w badanej glebie. Ze względu na żyzność gleb wzmożony rozwój grzybów jest zjawiskiem niekorzystnym. W badaniach stwierdzono pozytywny wpływ mniejszych dawek kompostu (K1, K2) na stan fitosanitarny gleby. Jedynie wyniki analiz w terminie II przeczą temu wnioskowi. W próbkach gleb pobranych najwcześniej (107. dzień) wartość wskaźnika była prawie 4-krotnie większa przy zastosowaniu dawki K2 w porównaniu z kontrolą. W kolejnych terminach analiz okazało się, że stan fitosanitarny gleby kontrolnej jest porównywalny lub lepszy od próbek z kompostem.



Rys. 11. Wskaźniki fitosanitarne gleby kontrolnej i gleby z różnymi dawkami kompostu (K, K1, K2, K3)

Fig. 11. Phytosanitary index of control soil and soil with different compost doses (K, K1, K2, K3)

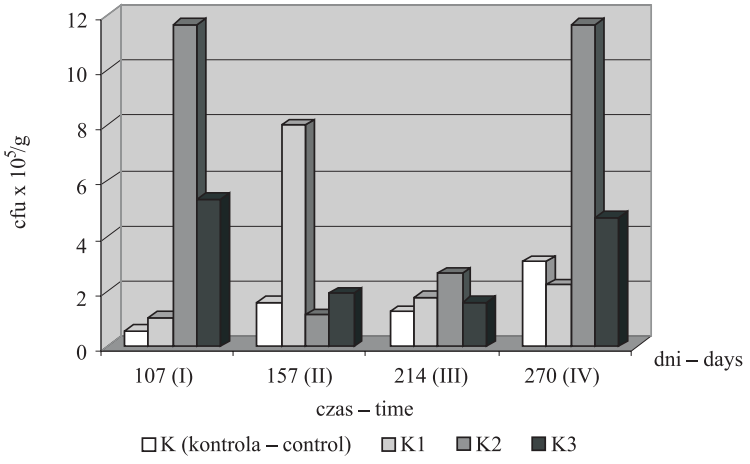
Na wzrost liczby bakterii pektynolitycznych wpływała zarówno dawka kompostu, jak i termin przeprowadzenia analizy (rys. 12). W pierwszym terminie doświadczenia zaobserwowano gwałtowne zwiększenie się populacji bakterii pektynolitycznych, bowiem aż 24-krotne pod wpływem dawki K2. W każdym kolejnym terminie badań różnica w liczbie badanych bakterii między próbką kontrolną a K2 wyraźnie się zmniejszała. Pod koniec doświadczenia w próbce z polepszaczem w dawce K2 było 1,5-krotnie więcej bakterii pektynolitycznych niż w kontroli. Najmniejsze dawki kompostu nie wpłynęły na zwiększenie populacji bakterii pektynolitycznych.



Rys. 12. Ogólna liczba bakterii pektynolitycznych w glebie z różnymi dawkami kompostu (K, K1, K2, K3)

Fig. 12. Total number of pectinolytic bacteria in soil with different compost doses (K, K1, K2, K3)

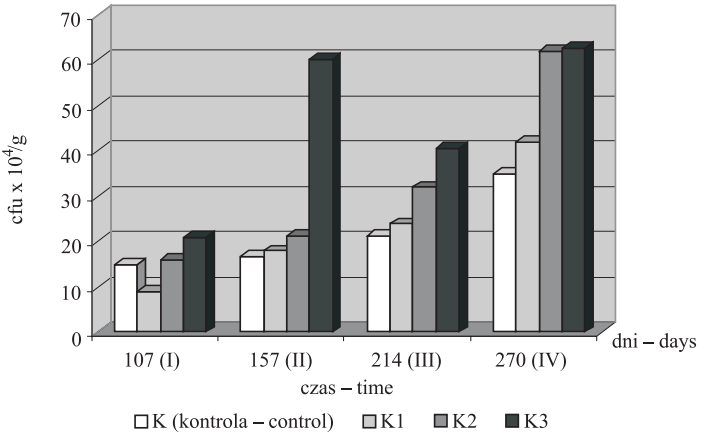
Liczba bakterii proteolitycznych ulegała dużym wahaniom w trakcie okresu badawczego (rys. 13). Najwyższe dawki polepszacza (K3) nie spowodowały proporcjonalnie większego przyrostu populacji mikroorganizmów proteolitycznych. Największy, gdyż prawie 12-krotny przyrost populacji uzyskano już po 107 dniach po zastosowaniu kompostu w dawce K2. Podobna zależność wystąpiła po 270 dniach, ale w tym przypadku liczba bakterii proteolitycznych była 4-krotnie większa w porównaniu z kontrolą.



Rys. 13. Ogólna liczba bakterii proteolitycznych w glebie z różnymi dawkami kompostu (K, K1, K2, K3)

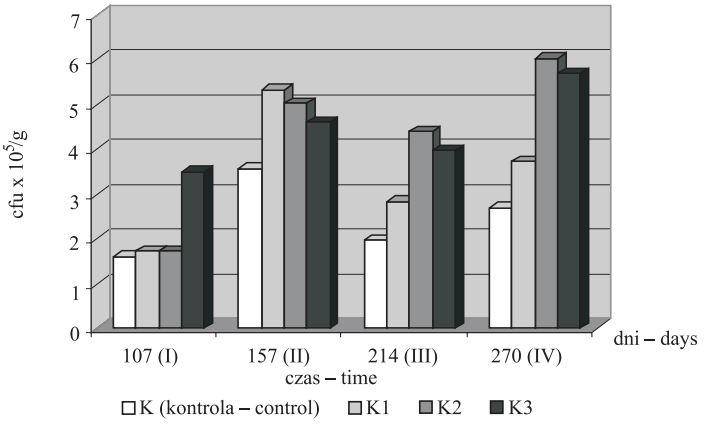
Fig. 13. Total number of proteolytic bacteria in soil with different compost doses (K, K1, K2, K3)

Wyraźny wpływ na wzrost populacji bakterii celulolitycznych obserwowano w trzech ostatnich terminach analiz. Stwierdzono, że wzrastające dawki kompostu wywoływały przyrost populacji badanych mikroorganizmów. Najdobitniej widać to było w 157. dniu doświadczenia, w którym populacja bakterii celulolitycznych na skutek zastosowania najwyższej dawki kompostu zwiększyła się 4-krotnie w porównaniu z kontrolą (rys. 14).



Rys. 14. Ogólna liczba bakterii celulolitycznych w glebie z różnymi dawkami kompostu (K, K1, K2, K3)
Fig. 14. Total number of cellulolytic bacteria in soil with different compost doses (K, K1, K2, K3)

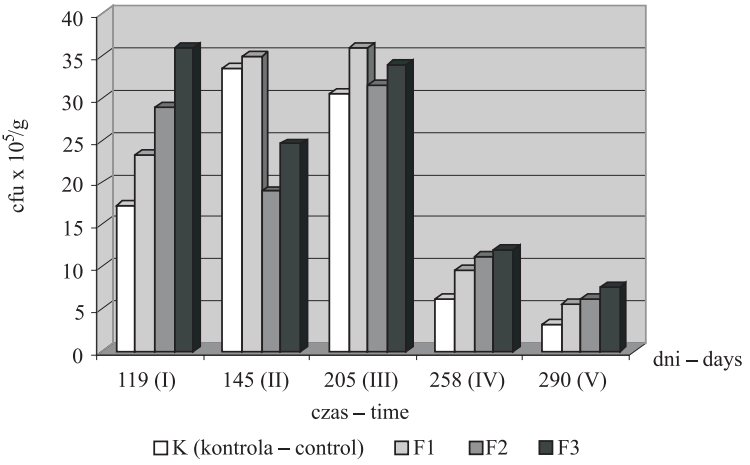
W przypadku bakterii amylolitycznych zauważono, że wzrost populacji rozpoczął się już w pierwszym analizowanym terminie pod wpływem największej dawki kompostu (rys. 15). W każdym następnym czasie analiz mniejsze dawki działały bardziej stymulująco na przyrost populacji.



Rys. 15. Ogólna liczba bakterii amylolitycznych w glebie z różnymi dawkami kompostu (K, K1, K2, K3)
Fig. 15. Total number of amylolytic bacteria in soil with different compost doses (K, K1, K2, K3)

4.4.2. Gleba z dodatkiem cieczy pofermentacyjnej

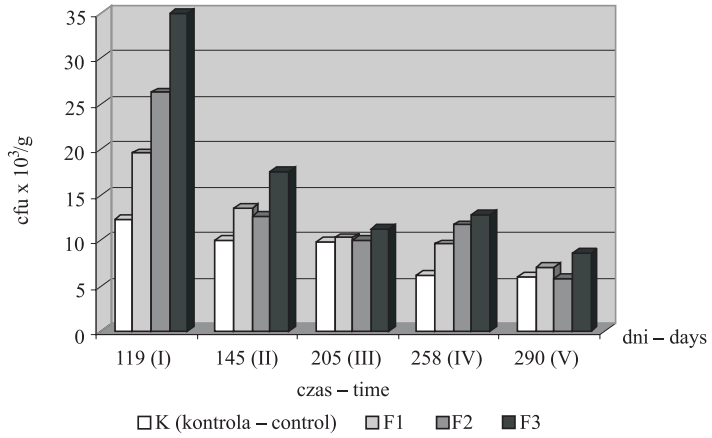
Najbardziej zauważalny wpływ „polepszacza" na zwiększenie ogólnej liczby bakterii w glebie miał miejsce w I, IV i V terminie badań (rys. 16). Wyższe jego dawki (F2, F3) spowodowały nawet dwukrotny przyrost populacji mikroorganizmów. W 145. i 205. dniu doświadczenia nie zaobserwowano stymulującego wpływu cieczy pofermentacyjnej na bakterie.



Rys. 16. Ogólna liczba bakterii w glebie z różnymi dawkami cieczy pofermentacyjnej (K, F1, F2, F3)

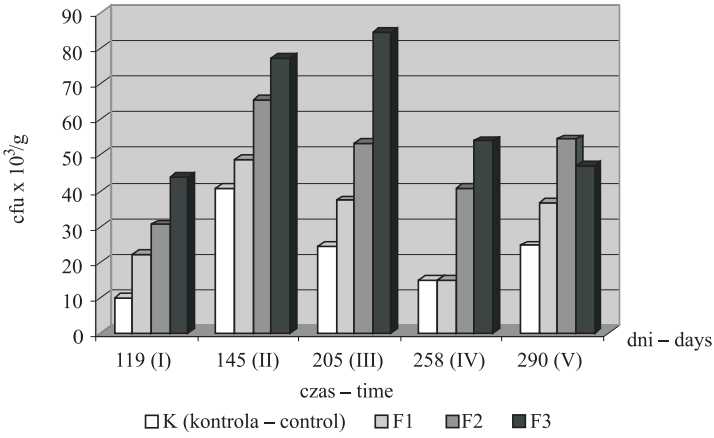
Fig. 16. Total number of bacteria in soil with different doses of digester sludge (K, F1, F2, F3)

Najwyraźniejszy wpływ „polepszacza" na wzrost populacji grzybów zaobserwowano w pierwszym terminie analiz (rys. 17), w którym coraz większe dawki cieczy powodowały stopniowy i bardzo wyraźny przyrost populacji grzybów. Pod wpływem najwyższej dawki cieczy pofermentacyjnej (F3) w tym terminie liczba grzybów zwiększyła się 3-krotnie. W późniejszych analizach nie wykazano już takiej zależności, zaobserwowano jednak, że dawki F3 najbardziej stymulowały wzrost grzybów.



Rys. 17. Ogólna liczba grzybów w glebie z różnymi dawkami cieczy pofermentacyjnej (K, F1, F2, F3)
Fig. 17. Total number of fungi in soil with different doses of digester sludge (K, F1, F2, F3)

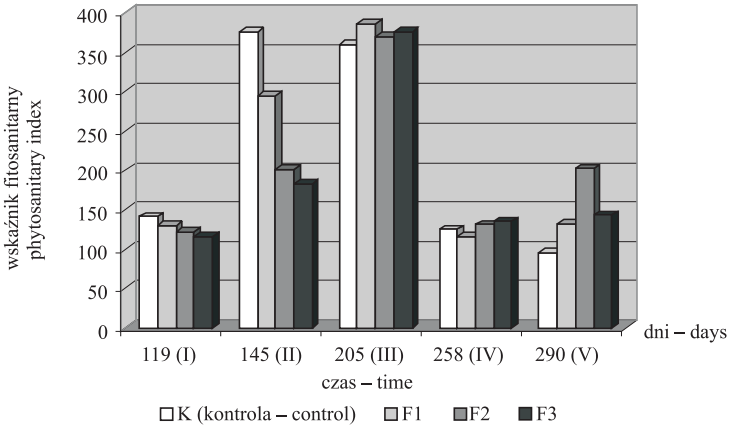
Dodatek cieczy pofermentacyjnej wyraźnie stymulował rozwój promieniowców (rys. 18). W większości przypadków ich populacja wzrastała wraz z dawką „polepszacza". Największe, 2-4-krotne, przyrosty liczby mikroorganizmów obserwowano po zastosowaniu dawek F2 i F3, najlepiej było to widoczne we wcześniejszych terminach analiz.



Rys. 18. Ogólna liczba promieniowców w glebie z różnymi dawkami cieczy pofermentacyjnej (K, F1, F2, F3)
Fig. 18. Total number of actinobacteria in soil with different doses of digester sludge (K, F1, F2, F3)

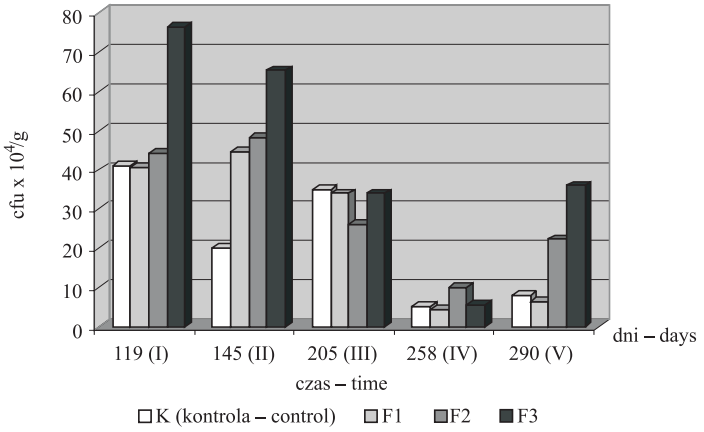
Określono wartości współczynnika fitosanitarnego dla każdej próby gleby i dla każdego terminu doświadczenia (rys. 19). Analizy wykonane w pierwszych dwóch terminach wskazywały negatywne działanie dodatku cieczy pofermenta-

cyjnej, gdyż współczynniki były niższe w porównaniu z kontrolą. W dwóch kolejnych, właściwie nie zaobserwowano żadnego większego wpływu kondycjonera na stan fitosanitarny gleby. W terminie ostatnim wartości wskaźnika w próbkach wzbogaconych o ciecz pofermentacyjną są wyższe w porównaniu z kontrolą.



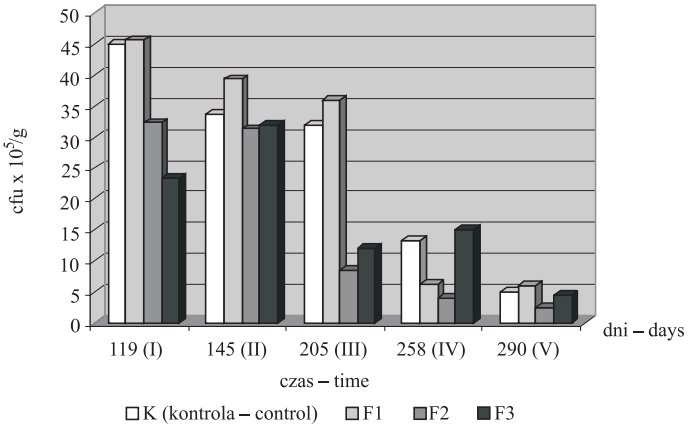
Rys. 19. Wskaźniki fitosanitarne gleby kontrolnej i gleb z różnymi dawkami cieczy pofermentacyjnej (K, F1, F2, F3)
Fig. 19. Phytosanitary index of control soil and soil with different doses of digester sludge (K, F1, F2, F3)

W próbkach gleby wzbogaconej w ciecz pofermentacyjną zaobserwowano wzrost liczby bakterii pektynolitycznych (rys. 20). Był on najlepiej widoczny w pier-wszym, drugim i piątym terminie analiz. Najwyższe dawki wywoływały 2-7-krotne zwiększenie liczby mikroorganizmów. Liczba mikroorganizmów w próbce kontrolnej i w próbkach użyźnionych była zbliżona w 205. i 258. dniu doświadczenia.



Rys. 20. Ogólna liczba bakterii pektynolitycznych w glebie z różnymi dawkami cieczy pofermentacyjnej (K, F1, F2, F3)
Fig. 20. Total number of pektynolytic bacteria in soil with different doses of digester sludge (K, F1, F2, F3)

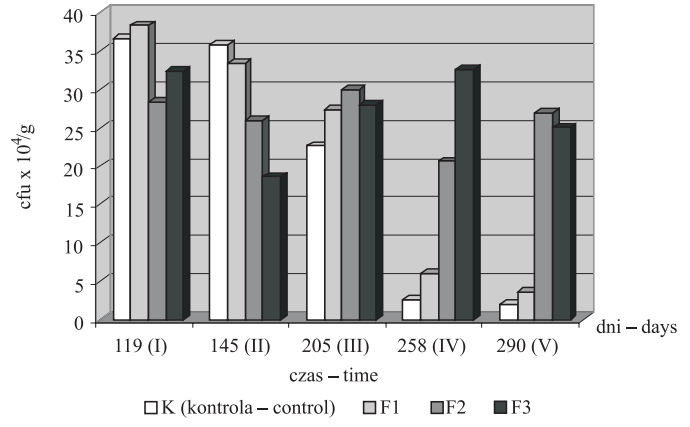
Analizy liczby bakterii proteolitycznych wskazują jednoznacznie, że ani dawka cieczy pofermentacyjnej, ani czas przebywania w glebie nie miał stymulującego wpływu na przyrost liczby mikroorganizmów, a w wielu przypadkach doszło nawet do znacznego (nawet 4- krotnego) jej obniżenia (rys. 21).



Rys. 21. Ogólna liczba bakterii proteolitycznych w glebie z różnymi dawkami cieczy pofermentacyjnej (K, F1, F2, F3)

Fig. 21. Total number of proteolytic bacteria in soil with different doses of digester sludge (K, F1, F2, F3)

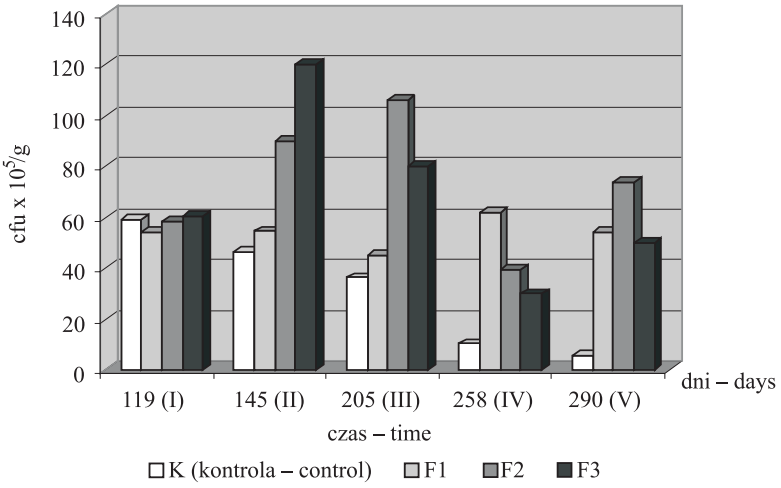
Wyniki badań bakterii celulolitycznych świadczą o tym, że dodatek cieczy pofermentacyjnej nie wywołał przyrostu ich populacji w trzech pierwszych terminach analiz, natomiast pod koniec doświadczenia podziałał na ich rozwój stymulująco (rys. 22). Wyższe dawki (F2, F3) zwiększyły ich liczbę nawet 12-16-krotnie.



Rys. 22. Ogólna liczba bakterii celulolitycznych w glebie z różnymi dawkami cieczy pofermentacyjnej (K, F1, F2, F3)

Fig. 22. Total number of cellulolytic bacteria in soil with different doses of digester sludge (K, F1, F2, F3)

W pierwszym terminie analiz nie zaobserwowano żadnego wpływu cieczy pofermentacyjnej na stan populacji bakterii amylolitycznych, jednak już w następnych terminach widać działanie stymulujące na zwiększenie liczby działanie kondycjonera (rys. 23). W 145. dniu analiz przyrastała ona proporcjonalnie do jego dawki, przy czym, przy największej – była czterokrotnie wyższa. W próbkach badanych w 205. i 290. doświadczenia taki proporcjonalny przyrost dotyczył tylko dwóch pierwszych dawek – F1 i F2. Najsilniejsze działanie stymulujące kondycjonera zaobserwowano w ostatnim terminie badań, w którym to liczba populacji bakterii amylolitycznych zwiększyła się 13-krotnie w porównaniu z kontrolą pod wpływem dodatku F2.



Rys. 23. Ogólna liczba bakterii amylolitycznych w glebie z różnymi dawkami cieczy pofermentacyjnej (K, F1, F2, F3)

Fig. 23. Total number of amylolytic bacteria in soil with different doses of digester sludge (K, F1, F2, F3)

4.5. SKŁAD CHEMICZNY I WŁAŚCIWOŚCI FIZYCZNE GLEBY I „POLEPSZACZY”

Wyniki analiz chemicznych produktu kompostowania i fermentacji oraz gleby kontrolnej przedstawiono w tabeli 68.

Tabela 68. Skład chemiczny gleby, kompostu i cieczy pofermentacyjnej
Table 68. Chemical composition of soil, compost and digester sludge

Parametr Parameter	Jednostka Unit	Wyniki – Results		
		gleba soil	kompost compost	ciecz pofermentacyjna digester sludge
pH w – in H_2O	pH	6,52	9,24	8,41
Sucha masa (s.m.) Dry matter (DM)	%	nb ne	79,5	3,87
Zawartość N_{og} TN content	% s.m. % DM	0,13	0,43	1,67
Zawartość N_{NH4} N_{NH4} content		nb ne	0,01	0,67
Substancja org. Organic matter		1,79	84,8	64,7
Zawartość P przyswajalnego Available P content	mg·100 g s.m. mg·100 g DM	24,4	nb ne	nb ne
Zawartość P_{og} TP content	% s.m. % DM	nb ne	0,59	0,41
Zawartość Ca Ca content			0,48	0,86
Zawartość Mg Mg content			0,08	0,18
Zawartość Cd Cd content	$mg \cdot kg^{-1}$ s.m. $mg \cdot kg^{-1}$ DM	<0,50	0,68	0,31
Zawartość Pb Pb content		15,1	<8,80	6,11
Zawartość Hg Hg content		0,11	0,005	0,009
Zawartość Zn Zn content		27,2	96,4	163
Zawartość Cu Cu content		2,82	13,9	8,12
Zawartość Cr Cr content		8,08	7,49	1,60
Zawartość Ni Ni content		9,53	10,8	0,79

nb – nie badano, ne – not examined

Dodatek kompostu do gleby spowodował niewielki, proporcjonalny do dawki, wzrost jej pH, co mogło być związane z zasadowym odczynem samego „polepszacza" (tab. 68). Ta zależność była lepiej widoczna w próbkach gleby z kompostem (K1, K2 i K3), których odczyn wzrósł z 6,52 (kontrola) do 6,87, podczas gdy w przypadku cieczy pofermentacyjnej osiągnął maksymalną wartość rzędu 6,54 (tab. 69). Wprowadzenie kompostu spowodowało niewielki wzrost zawartości substancji organicznej we wszystkich przypadkach (K1, K2 i K3), ale tylko najwyższa dawka produktu fermentacji (F3) spowodowała podobny efekt. Zawartość azotu ogółem nieznacznie wzrosła w próbkach z kompostem (wraz z dawką), natomiast dodatek cieczy pofermentacyjnej spowodował niewielkie obniżenie jego zawartości.

Tabela 69. Skład chemiczny gleby po zastosowaniu różnych dawek kompostu i cieczy pofermentacyjnej

Table 69. Chemical composition of soil after using of different compost and digester sludge doses

Parametr Parameter				Jednostka Unit	Wyniki – Results						
					K	K1	K2	K3	F1	F2	F3
pH w – in H_2O				pH	6,52	6,63	6,71	6,87	6,37	6,41	6,54
Zawartość N_{og} TN content				% s.m. % DM	0,13	0,13	0,14	0,15	0,11	0,09	0,11
Substancja organiczna Organic matter				% s.m. % DM	1,79	1,81	1,81	2,03	1,68	1,60	1,84
Zawartość P przyswajalnego Available P content				mg·100 g s.m. mg·100 g DM	24,4	20,1	22,1	21,3	18,4	17,3	19,5
Metal	dopuszczalne stężenia permissible concentration										
	grunty lekkie light soils	grunty średnie medium soils	grunty ciężkie heavy soils								
Cd	1	2	3	mg·kg^{-1} s.m. mg·kg^{-1} DM	<0,50	0,47	<0,50	0,57	0,61	0,63	<0,50
Pb	40	60	80		15,1	17,8	17,9	21,4	27,4	19,82	25,1
Hg	0,8	1,2	1,5		0,11	0,095	0,10	0,087	0,071	0,087	0,077
Zn	80	120	180		27,2	30,6	35,1	41,3	33,9	36,4	34,6
Cu	25	50	75		2,82	4,52	4,55	5,17	5,42	4,96	6,20
Cr	50	75	100		8,08	7,36	6,32	6,19	6,02	5,18	5,93
Ni	20	35	50		9,53	6,18	7,45	5,08	6,99	6,55	7,07

W glebie kontrolnej zmiany w dynamice węgla glebowego były wolniejsze niż w obiektach nawożonych (tab. 70). Prawie każda wprowadzona do gleby dawka kompostu czy cieczy pofermentacyjnej powodowała proporcjonalny wzrost zawartości wszystkich frakcji węgla. Najwyższą zawartość węgla organicznego (C_T) stwierdzono w glebie z najwyższą dawką kompostu (K3). W tej próbce zaobserwowano również znaczący przyrost zawartości węgla labilnego C_L (o 6,95%) w stosunku do obiektu kontrolnego, jednak najwyższy wzrost tej frakcji węgla obserwowano w próbce K1, aż o 11,05%, mimo iż wzrost zawartości C_T spowodowany nawożeniem w tym obiekcie był niewielki (o 0,5%). Nawożenie najwyższą dawką cieczy pofermentacyjnej (F3) spowodowało obniżenie zawartości węgla labilnego o 2,94% w stosunku do próbki kontrolnej i jednocześnie do przyrostu zawartości węgla nielabilnego.

Tabela 70. Zawartość węgla organicznego (C_T), węgla labilnego (C_L), nielabilnego (C_{NL}) w „polepszaczach" i próbkach glebowych

Table 70. Organic carbon (C_T), labile carbon (C_L) and non-labile carbon content (C_{NL}) in soil improvers

Próbka Sample	C_T		C_L		C_{NL}	
	$g \cdot kg^{-1}$	%	$g \cdot kg^{-1}$	%	$g \cdot kg^{-1}$	%
Gleba Soli	6,00	0,60	2,09	34,87	3,91	65,13
Kompost Compost	421,10	42,11	75,50	17,93	345,59	82,07
K1	6,50	0,65	2,99	45,92	3,52	54,08
K2	7,40	0,74	2,75	37,22	4,65	62,68
K3	8,10	0,81	3,39	41,82	4,71	58,18
Ciecz pofermentacyjna Digester sludge	348,40	34,84	77,98	22,38	270,42	77,62
F1	6,20	0,62	2,51	40,47	3,69	59,53
F2	6,30	0,63	2,52	40,06	3,78	59,94
F3	6,40	0,64	2,04	31,93	4,36	68,07

5. DYSKUSJA

Wykorzystanie bogatych w wartości nawozowe odpadów organicznych do celów rolniczych jest związane z ryzykiem rozprzestrzeniania się patogenów w środowisku. Szczególne zagrożenie stanowią odpady pochodzące od chorych zwierząt, nosicieli czy też odpady skażone fekaliami. Są one nośnikiem wielu chorobotwórczych bakterii, wirusów, grzybów i pasożytów [Doyle i Schoeni 1987, Harrison i wsp. 2001, Nørrung i Buncic 2008]. Zastosowanie takich odpadów jako nawozu bez wcześniejszej sanityzacji mogłoby się wiązać ze skażeniem roślin, a w konsekwencji – człowieka i zwierząt. Warunkiem rolniczego wykorzystania odpadów mięsnych bezpiecznego dla środowiska jest ich skuteczna sanityzacja z zastosowaniem różnych biotechnologii, wśród których należy wymienić kompostowanie i fermentację beztlenową. Skuteczność tych procesów można oszacować m.in. na podstawie monitorowania przeżywalności wybranych mikroorganizmów, do których należą: termooporny szczep *Salmonella* Senftenberg W_{775}, termooporne wirusy BPV, wirusy choroby Aujeszky'ego, pałeczki *Escherichia coli*, paciorkowce kałowe i jaja *Ascaris suum*. Zakłada się, że jeżeli ulegną zniszczeniu, zwłaszcza mikroorganizmy termooporne, to z dużym prawdopodobieństwem zginą również inne drobnoustroje, zwłaszcza patogeny. Kompostowanie odpadów mięsnych nie poddanych uprzedniej obróbce termicznej wymaga szczególnej uwagi. Jakkolwiek Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego nr 1774 [2002] i 1069 [2009] dopuszcza do kompostowania odpady 3. kategorii, które nie stanowią zagrożenia epidemiologicznego, to jednak nie można wykluczyć przypadkowego zawleczenia patogennych bakterii i wirusów. Dane literaturowe wskazują, że poza mikroorganizmami patogennymi dla zwierząt, takimi jak wirus pryszczycy czy pomoru afrykańskiego świń, mogą się w nich znajdować drobnoustroje patogenne dla ludzi. Na uwagę zasługują zwłaszcza pałeczki *Salmonella* sp., *Campylobacter* sp. oraz *Escherichia coli* O:157 [Doyle i Schoeni 1987, Farez i Morley 1997, Harrison i wsp. 2001].

KOMPOSTOWANIE

Stopień inaktywacji drobnoustrojów w trakcie kompostowania uzależniony jest w dużym stopniu od ilości materiału zakaźnego, który w warunkach produkcyjnych może nie podlegać samozagrzaniu lub zalegać w części kontenera, w którym panująca temperatura jest zbyt niska [Haug 1993]. Kompostowanie w bioreaktorach umożliwia ścisłą kontrolę parametrów decydujących o prawidłowym przebiegu procesu, takich jak temperatura, wilgotność czy ilość tlenu w biomasie [Dach i wsp. 2003, Stelmachowski i wsp. 2003, Czekała i wsp. 2006]. Najważniejszym czynnikiem decydującym o sanityzacji biomasy podczas kompostowania jest temperatura, która sprzyja intensywności procesów rozkładu masy kompostowej i wpływa na inaktywację znajdujących się w niej patogenów. Böhm [2004] podaje, że temperatura 55°C powinna utrzymywać się

przez okres przynajmniej dwóch tygodni w systemie pryzmowym lub 65°C przez tydzień w zamkniętych bioreaktorach, aby doszło do eliminacji mikroorganizmów chorobotwórczych. Hamer [2003] uważa jednak, że procesy, w trakcie których dochodzi do samozagrzewania biomasy i rozwoju fazy termofilnej nie zawsze prowadzą do całkowitej sanityzacji. Gale [2004] również twierdzi, że przy spodziewanym spadku liczby patogenów o 6 log, gdy chociaż 1% materiału skażonego omija strefę podwyższonej temperatury, obserwuje się redukcję miana wirusów tylko o 2 log w materiale końcowym. Zjawisko to odgrywa mniejszą rolę w przypadku niewielkiego skażenia materiału.

W badaniach własnych przebieg temperatury różnił się w kolejnych cyklach kompostowania, a temperatura maksymalna kształtowała się w granicach od 49,6 do 68,1°C, co miało wpływ na różną przeżywalność badanych mikroorganizmów. Pałeczki *E. coli* zginęły najszybciej, bowiem już w pierwszej dobie cyklu 5, w którym zanotowano najdłużej utrzymującą się wysoką temperaturę (50-60ºC przez około 66 godzin), niezależnie od typu nośnika i lokalizacji próbek. W cyklach, w trakcie których maksymalna temperatura była niewiele niższa (57-59°C), bakterie przeżyły od 102 do 112 godzin. W ostatnich terminach analiz przeprowadzonych dla wszystkich sześciu cykli kompostowania nie wyizolowano pałeczek *E. coli* z żadnej próbki. Wydaje się, że ani wielkość, ani rodzaj nośnika nie miał znaczenia w ochronie pałeczek przed inaktywacją. Jedynie pod koniec cyklu 2. bakterie w trzonach kości występowały w koncentracji nawet o 5 cykli log większej niż w małym nośniku mięsnym. Być może wynikało to z faktu, że ścianki kości dobrze chroniły bakterie przed wysoką temperaturą biomasy. Produkt każdego cyklu kompostowania był jednak wolny od pałeczek *E. coli*. Przeżywalność pałeczek *Salmonella* Senftenberg W_{775} była w podobny sposób zależna od temperatury jak w przypadku *E. coli*. Mimo swojej termooporności, w cyklach z dłużej utrzymującą się podwyższoną temperaturą pałeczki bardzo szybko ulegały inaktywacji. Tak było w trakcie cyklu 4., w którym temperatura w zakresie 50-60°C utrzymywała się przez 3 doby, a także w cyklu 1. kompostowania, w którym średnia temperatura była nawet o 10°C niższa. Całkowity czas przeżywania tych bakterii w obu cyklach wahał się między 69,3 a 86,3 godzin dla bakterii w nośnikach mięsnych, w trzonach kości pałeczki *Salmonella* przeżyły o ok. 20 godzin dłużej.

Badając różne systemy kompostowania osadów ściekowych Shaban [1999] zaobserwował również bardzo powolną eliminację paciorkowców fekalnych we wszystkich analizowanych obiektach. Znacznie szybciej od nich ginęły pałeczki z rodzaju *Salmonella* i *Escherichia coli*. W pryzmie z wymuszonym obiegiem powietrza ginęły już po 9 dniach, natomiast enterokoki izolowano jeszcze do 73. dnia procesu. W badaniach własnych również zaobserwowano podobną zależność. Porównując przebieg temperatury różnych cykli kompostowania z liczbą paciorkowców oznaczanych w trakcie trwania procesów wyraźnie widać, że dopiero od momentu uzyskania przez biomasę temperatury bliskiej 60°C liczba bakterii zaczynała szybko spadać (cykl 1., 2. i 3.). Do tego czasu wykrywane były w wysokiej koncentracji we wszystkich nośnikach i miejscach kom-

postera. Pałeczki *E. coli* i *Salmonella* inaktywowane były 24-36 godzin wcześniej. Paciorkowce najkrócej przeżyły 125,8-167 godz. w cyklu 1., w którym temperatura 60°C we wszystkich lokalizacjach utrzymywała się przez około 6 godzin, najdłużej zaś w cyklu 3., bo od 321,5 do 366,5 godz. Zarówno miejsce usytuowania próbek w urządzeniu, jak i typ nośnika nie wpływały na tempo eliminacji paciorkowców w trakcie procesów kompostowania.

Jak twierdzi Feachem i wsp. [1983], prawidłowo przebiegający proces kompostowania powinien przed upływem jednego miesiąca doprowadzić do redukcji populacji drobnoustrojów wskaźnikowych do poziomu uniemożliwiającego ich wykrycie. W niektórych przypadkach, w wyniku stworzenia optymalnych warunków kompostowania już w ciągu 14 dni może dojść do spadku liczby pałeczek okrężnicy, aż o 7 cykli logarytmicznych. Satriana [1974] podaje również, że w prawidłowo przeprowadzonym procesie kompostowania następuje pełna eliminacja pałeczek *E. coli*. W badaniach własnych uzyskano podobne wyniki. Na podstawie równań prostych regresji opisujących tempo inaktywacji pałeczek stwierdzono, że czas potrzebny do wyeliminowania bakterii wprowadzonych do nośników wahał się pomiędzy 78,8 a 284 godzinami (3,3 dnia a 11,8 dnia). Podobne wyniki uzyskała w swoich badaniach Szejniuk i wsp. [1999], stwierdzając że działanie temperatury w granicach 50°C przez 10 dni wystarcza do zniszczenia pałeczek *Salmonella*. Temperatura jest najważniejszym ze wszystkich czynników decydujących o należytym przeprowadzeniu procesu sanityzacji. Utrzymanie jej na odpowiednim poziomie powoduje wyeliminowanie patogenów obecnych w odpadach. Większość autorów podaje, że kilkudniowe kompostowanie odpadów w temperaturze powyżej 50°C powoduje zniszczenie mikroorganizmów chorobotwórczych. Według Epsteina [1997] do zredukowania liczby pałeczek *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* i paciorkowców kałowych dochodzi w zakresie temperatur 55-65°C. Autor twierdzi, że po 14 dniach kompostowania materiał końcowy nie zawierał patogenów. Joshua i wsp. [1994] przeprowadzili proces kompostowania w cyklach trwających od 5 do 11 dni. W doświadczeniu posłużyli się zamkniętym reaktorem o wymuszonym systemie napowietrzania. W ciągu pierwszych 48 godzin temperatura wynosiła 65°C, później wahała się w granicach 46-50°C. W wyniku procesu uzyskano kompost dobrej jakości pod względem higienicznym. Temperatura jest głównym, ale nie jedynym czynnikiem sprawczym eliminacji mikroorganizmów patogennych w czasie procesu kompostowania. Wilgotność, stężenie amoniaku oraz obecność innych mikroorganizmów również przyczyniają się do eliminacji patogenów [Turner 2002]. Wykazano, że w pryzmie kompostowej, której wilgotność wynosiła 60-65% *Salmonella* Senftenberg W_{775} wprowadzona do nośników mięsnych przeżywała 10 godzin, natomiast czas ten wydłużał się, gdy wilgotność spadła o 5% [Ceustermans i wsp. 2007]. Poza tym, wiele gatunków grzybów i promieniowców produkuje substancje antybiotyczne i niekiedy już w temperaturze 4ºC dochodzić może do redukcji liczby drobnoustrojów i w ten sposób do odkażenia kompostu [Golueke 1974, Walter-Matsui 1978]. W przypadku nieprawidłowo przeprowadzonego procesu kompostowania efekt

sanityzacyjny jest niewystarczający. Rezultat taki uzyskali Gantzer i wsp. [2001] badając efekty różnych technik uzdatniania osadów ściekowych. W osadach kompostowanych z dodatkiem trocin badacze ci stwierdzili tylko nieznaczną redukcję liczby pałeczek *E. coli* o 1,7-1,8 jednostek logarytmicznych. Powodem tego mogła być zbyt mała porowatość pryzmy, jej wtórna kontaminacja lub ponowne namnożenie pałeczek, które okazały się oporne na niekorzystne warunki panujące w kompostowanej pryzmie. Podsumowując bakteriologiczne wyniki badań własnych przeprowadzonych w trakcie kompostowania należy stwierdzić, że uzyskano satysfakcjonującą redukcję badanych drobnoustrojów w biomasie. Zgodnie z Rozporządzeniem Komisji (WE) nr 208/2006 [2006], powinno dojść do zmniejszenia o 5 cykli log liczby bakterii *Enterococcus faecalis* lub *Salmonella* Senftenberg. Wyjątkiem był cykl 6. kompostowania z maksymalną temperaturą 49,5^{o}C, w trakcie którego zaobserwowano niewystarczającą redukcję pałeczek *Salmonella w* większości nośników. Nie analizowano jednak liczby bakterii w ostatnim terminie doświadczenia, tj. w 120. godzinie, zatem nie ma pewności, czy redukcja w tym czasie miała miejsce. W trakcie procesu kompostowania mogą wystąpić warunki sprzyjające namnażaniu mikroorganizmów patogennych, zwłaszcza przy braku fazy termofilnej, albo zanim ona wystąpi. Wichuk i McCartney [2007] obserwowali takie zjawisko w przypadku bakterii jelitowych w kompostowanej biomasie. Badania własne również wskazują, że w trakcie kilku cykli kompostowania doszło do zwiększenia liczby badanych bakterii.

Odpady organiczne, zwłaszcza te pochodzące z rzeźni i innych zakładów, bardzo często zawierają jaja nicieni żołądkowo-jelitowych z rodzaju *Ascaris*, *Trichuris* i *Toxocara* [Johnson i wsp., 1998 Gantzer i wsp.2001]. Są one szczególnie niebezpieczne ze względu na dużą oporność na czynniki środowiskowe [Bergstrom i Langeland 1981]. Gantzer i wsp. [2001] stwierdzali w osadach ściekowych obecność średnio od 2 do 53 jaj pasożytów w 1 kg s.m. Wśród nich 34,8% stanowiły jaja *Ascaris*, 37,7% *Trichuris*, 13,7% *Toxocara* i 13,8% jaja *Capillaria*. Odsetek jaj żywych pozostawał w przedziale od 24 do 100% we wszystkich badanych próbkach. Fakt ten łączy się bezspornie z dużą liczbą jaj wydalonych przez pasożyty do kału, np. dorosła samica *Ascaris suum* wydala średnio około 200 000 jaj, a w niektórych wypadkach nawet do 1 600 000 jaj w ciągu doby [Boch i Supperer 1983]. W ocenie skuteczności sanityzacji odpadów powszechnie stosuje się jaja *Ascaris suum*, ponieważ są one łatwe do pozyskania, a ponadto bardzo oporne na działanie czynników środowiskowych [Von der Heide 1973]. Wprawdzie jaja *Taenia* sp. są bardziej oporne na wysoką temperaturę, ale ze względu na powolną sedymentację nie pozostają w osadzie, lecz przedostają się z oczyszczonymi ściekami do środowiska [Strauch 1991]. W badaniach własnych zaobserwowano zależność pomiędzy odsetkiem żywych jaj *Ascaris suum a* temperaturą poszczególnych cykli kompostowania. W cyklu 6., w którym temperatura biomasy nie przekroczyła 50^{o}C odsetek jaj inwazyjnych utrzymywał się na wysokim poziomie we wszystkich miejscach kompostera i wynosił 76-92%. Przeżywalność jaj w tym procesie obliczono na 21-54

dni. Obserwacje te wskazują na dużą oporność jaj pasożytów w środowisku o niższej temperaturze. Veerannan [1977] wykazał, że dopiero po 3 latach składowane w niskich temperaturach (13^{o}C) osady pościekowe były wolne od inwazyjnych jaj *Ascaris suum*. Liczne obserwacje, dość rozbieżne w zakresie ustalenia temperatur skutecznych dla ich likwidacji, wskazują, że również w procesach fermentacji beztlenowej osadów w warunkach mezofilnych jaja nie tracą zdolności do dalszego rozwoju [Pike i wsp. 1988, Carrington i wsp. 1991]. W osadach poddawanych stabilizacji tlenowej w warunkach mezofilnych znajdowano od 30 do 98% jaj żywych. Dopiero w warunkach termofilnych dochodzi do pełnej inaktywacji jaj [Pohlig-Schmidtt 1987, Plym-Forshell 1995]. Jest to efektem inaktywacji systemów enzymatycznych jaja. Reimers i wsp. [1981] w temperaturze 57^{o}C obserwowali inaktywację po 2 dniach, zaś Feachem i wsp. [1978] w temperaturze 62^{o}C – po 1 godzinie. Należy podkreślić, że zastosowana metoda badań inaktywacji jaj przy użyciu perlonowych woreczków okazała się bardzo praktyczna i o wiele łatwiejsza od metod tradycyjnych. Uważa się, że tempo obumierania jaj w tego typu nośnikach jest nieco powolniejsze niż wtedy, gdy wprowadzone są bezpośrednio w biomasę. Z jednej strony duża koncentracja jaj może wpływać hamująco na embriogenezę, z drugiej zaś kontakt jaj ze środowiskiem znajdujących się w nośniku jest nieco utrudniony [Eriksen 1990]. Oksanen i wsp. [1990] dowiedli także, że infekcyjność pozyskiwanych jaj bezpośrednio z macicy nicieni jest porównywalna do tych, które w sposób naturalny znalazły się w środowisku.

Wirusy oznaczane są w odpadach organicznych zdecydowanie rzadziej niż inne patogeny ze względu na brak prostych metod ich izolacji w zanieczyszczonych próbach. Aktualny stan badań sugeruje, iż wpływ środowiska na inaktywację wirusów jest wieloraki. Obok temperatury na ich eliminację w ściekach i odpadach wpływa również podwyższona zawartość amoniaku, detergenty, metale ciężkie oraz proteazy i nukleazy innych mikroorganizmów [Ward i Ashley 1978 i 1980, Babich i Stotzky 1979]. W podwyższonej temperaturze białka wirusa, kapsomery i otoczki, ulegają denaturacji. Jest ona tym skuteczniejsza, im wyższa jest wartość temperatury, co udowodnili Wekerle i wsp. [1987]. Uważa się, że wirusy, które posiadają otoczkę dłużej przeżywają w niekorzystnych warunkach środowiska niż bezotoczkowe [Mahnel 1983]. W odpadach wirusy mogą zachowywać aktywność dłużej niż 4 miesiące, natomiast w glebie przeżywają od 150-170 dni i zjawisko to zależy, m.in. od wartości pH, temperatury i wilgotności [Kelly 1978]. Także adsorpcja wirusów na/w cząstkach stałych gleby czy odpadów zapewnia dodatkowy efekt ochronny [Sanders i wsp. 1979, Hurst i wsp. 1980]. Określenie aktywności wirusa w odpadach poddanych procesom uzdatniania jest trudnym zadaniem. W większości przypadków zawiesina wirusów jest wprowadzana w biomasę odpadów, a następnie oznacza się spadek miana wirusa, jest to jednak proces skomplikowany technicznie [Lund i Nissen 1983]. Do badania przeżywalności wirusów w środowisku wykorzystuje się szczepy laboratoryjne. Uważa się jednak, że są one bardziej wrażliwe na czynniki fizykochemiczne niż wirusy naturalnie występujące w środowisku

[Koch i Strauch 1981]. W badaniach własnych testowano dwa gatunki wirusów – wirus choroby Aujeszky'ego (wirus chA) oraz termoodporny parwowirus bydlęcy (BPV). Analizowano ich przeżywalność w cyklach, w których przebieg temperatury był odmienny, i których temperatury maksymalne różniły się aż o 10°C. Wirus chA wprowadzony do nośników analizowanych w cyklu z niższą temperaturą nie był wykrywany już w pierwszym terminie – po 72 godzinach. Z kolei, parwowirus wprowadzony do analogicznych nośników tego samego cyklu wykrywany był jeszcze w 126 godzinie procesu, jego miano spadło o 3,5--4,5 cykle log. Typ nośnika nie miał większego wpływu na tempo eliminacji wirusa, w każdym przypadku wynosiło ono ok. 0,03 $\log \cdot godz^{-1}$. Zgodnie z Rozporządzeniem Komisji (WE) nr 208/2006 [2006] za skuteczną sanityzację należy uznać taką, w której zakaźność parwowirusa obniży się o co najmniej 3 cykle log. W analizowanym cyklu redukcja ta była wystarczająca, by produkt uznać za bezpieczny pod względem sanitarnym. W przeciwnym przypadku istniałoby ryzyko dostania się tego wirusa do środowiska glebowego, skażenia powierzchni roślin, a nawet dostania się do ich wnętrza poprzez system korzeniowy [Seidel 1983].

Fermentacja beztlenowa jest alternatywną metodą utylizacji coraz powszechniej stosowaną w wielu krajach. Zainteresowanie tym sposobem biodegradacji odpadów organicznych ciągle rośnie z uwagi na szereg zalet, takich jak: produkcja energii odnawialnej w postaci biogazu, możliwość wykorzystania jako nawozu rolniczego pozostałości pofermentacyjnych, minimalizacja odorów, ograniczenie zanieczyszczenia środowiska. Ostatnio szczególną uwagę zwraca się na aspekty związane z sanityzacją biomasy podczas fermentacji metanowej. Produkcja biogazu z maksymalną wydajnością z danego typu odpadów stała się tak samo ważna jak wytworzenie bezpiecznego, wysokiej jakości nawozu, który można wykorzystać w środowisku naturalnym. Ocenę skuteczności sanityzacji podczas badań własnych prowadzono w dwóch wariantach temperaturowych: w 37°C oraz 55°C.

FERMENTACJA W WARUNKACH MEZOFILNYCH

Fermentację w warunkach mezofilnych przeprowadzają bakterie żyjące w temperaturze 30-35°C. Proces trwa wtedy przez okres około 27 dni [Jędrczak i Haziak 2005]. Zakres mezofilny temperatur jest najczęściej stosowany, gdyż zapewnia względnie stałą aktywność biocenozy oraz szerokie spektrum gatunkowe bakterii, co pozwala na kompleksowy rozkład substratów. Sanityzacja podczas procesu fermentacji beztlenowej zależy od wielu czynników, takich jak: temperatura, pH, zawartość lotnych kwasów tłuszczowych oraz kwasów organicznych. Znaczący spadek liczby bakterii oznacza eliminację 90% populacji drobnoustrojów chorobotwórczych, czyli spadek ich liczby o 1 cykl log w określonym czasie, który w przypadku fermentacji w warunkach mezofilnych jest podawany zwykle w dobach. Gadre i wsp. [1986] w swoich badaniach nad przeżywalnością *Salmonella* Typhimurium *w* odchodach bydła poddanych fer-

mentacji beztlenowej w 37°C stwierdzili, że całkowita eliminacja tych bakterii nastąpiła w ciągu 10 dni. W piśmiennictwie istnieją jednak pewne rozbieżności dotyczące skuteczności sanityzacji w warunkach mezofilnych, w niektórych publikacjach kwestionuje się tak szybką eliminację bakterii. Według Böhma [2004] fermentacja w warunkach mezofilnych nie gwarantuje efektywnej eliminacji bakterii z rodzaju *Salmonella*, *Enterococcus* oraz wirusów BPV i ECBO. Watanabe i wsp. [1997] przeprowadzający badania nad inaktywacją patogenów w osadach poddanych fermentacji w temperaturze 35°C przy hydraulicznym czasie zatrzymania (HRT) wynoszącym od 10 do 30 dni stwierdzili, że liczba pałeczek jelitowych wahała się w granicach od 10^2 do 10^4 NPL·g^{-1} bez względu na HRT, z kolei bakterie z rodzaju *Enterococcus* izolowano w ilości 10^2-10^5 NPL·g^{-1}, a liczba pałeczek *Salmonella* wynosiła ok. 10 NPL·g^{-1}. W badaniach własnych temperatura utrzymywała się na stałym poziomie 37°C i w tych warunkach zaobserwowano wyraźną tendencję spadku liczby badanych bakterii. Najszybszej inaktywacji uległy pałeczki *Escherichia coli* oraz pałeczki *Salmonella*. Nie izolowano ich po 7. dniu trwania procesu fermentacji w warunkach mezofilnych. Wyjątkiem są pałeczki okrężnicy, które po 18 godzinach obecne jeszcze były w trzonach kości. Paciorkowce cechowały się najwyższą opornością spośród wszystkich badanych bakterii, gdyż były obecne w każdym typie nośnika przez cały okres badawczy. W ostatnim terminie analiz, tj. w 21. lub w 28. dniu następował spadek ich liczby o 3-6 cykli log w porównaniu z próbką kontrolną. Z uwagi na mniejsze tempo eliminacji paciorkowców w stosunku do pozostałych bakterii możliwe było wyznaczenie równania regresji i całkowitego czasu przeżywalności, który wynosił od 26 do 70 dni. Nie zaobserwowano zależności przeżywania paciorkowców od typu nośnika z jednym wyjątkiem. W 2. cyklu fermentacji bakterie te najdłużej wykrywane były w trzonie kości, a ich redukcja wyniosła 3 log. Jaja *Ascaris suum* inaktywowane były w ciągu dwóch tygodni. Wysoka skuteczność sanityzacyjna fermentacji w warunkach mezofilnych wskazuje na fakt, że temperatura nie jest bezpośrednim czynnikiem odpowiedzialnym za inaktywację patogenów, zatem stopień oporności termicznej badanych bakterii, wirusów i jaj ma drugorzędny wpływ na ich przeżywalność [Smith i wsp. 2005]. Wnioski te znalazły potwierdzenie w badaniach własnych, gdyż w przypadku pałeczek *Salmonella* Senftenberg W_{775}, będących serotypem o wysokiej termooporności zaobserwowano całkowitą eliminację już po 14 dniach procesu fermentacji. W przypadku pałeczek *Escherichia coli* czy paciorkowców można również wykluczyć istotny wpływ temperatury na tempo ich inaktywacji, bowiem takie warunki termiczne sprzyjały rozwojowi bakterii. Jak podaje Smith i wsp. [2005], głównymi czynnikami odpowiedzialnymi za sanityzację fermentowanej biomasy w warunkach mezofilnych są antagonizm między mikroorganizmami, ograniczenie dostępności składników odżywczych, a także substancje toksyczne, takie jak amoniak, siarkowodór i lotne kwasy organiczne. Podniesienie stężenia amoniaku mogą powodować odpady poubojowe o wysokiej zawartości białka. Dyfunduje on do wnętrza komórek, powodując zakłócenie równowagi kwasowo-zasadowej. Innym związkiem, który mógł

przyczynić się do skutecznej eliminacji patogenów był siarkowodór. Mechanizm jego toksycznego działania nie jest w pełni poznany. Uważa się np., że pierwiastki śladowe (Ni, Co, Mo, Fe) tworzą z siarczkami trudno rozpuszczalne związki i przez to stają się one niedostępne dla bakterii [Jędrczak i Haziak 2005].

Johnson i wsp. [1998] w swoich badaniach nad przeżywalnością jaj *Ascaris suum w* trakcie fermentacji beztlenowej w warunkach mezofilnych, stwierdzili ich wysoką przeżywalność, która wynosiła po 7 dniach 95%, natomiast po 5 tygodniach – jeszcze 51%. Juris i wsp. [1996] obliczyli, że 20-dniową fermentację gnojowicy świńskiej w warunkach mezofilnych przeżywa aż 82% jaj. W badaniach własnych zaobserwowano znacznie szybszą inaktywację jaj *Ascaris suum*. Wystarczyło 14-18 dni, aby ich żywotność spadła do zera. Być może, podobnie jak w przypadku bakterii, warunki panujące w bioreaktorze oraz toksyczne produkty uboczne procesu fermentacji beztlenowej przyczyniły się do skutecznej inaktywacji jaj pasożytów jelitowych.

Wyniki badań wirusologicznych wskazują na znacznie krótszą przeżywalność wirusów choroby Aujeszky'ego w porównaniu z parwowirusami bydlęcymi w warunkach mezofilnych. Tych pierwszych nie wykrywano już w szóstej godzinie procesu, podczas gdy spadek miana parwowirusów po 4 tygodniach wyniósł tylko 2 log, czyli 0,085 log w ciągu doby. Podobne wyniki uzyskał Hoferer [2001], który badał przeżywalność parwowirusów w gnojowicy świńskiej poddanej fermentacji w warunkach mezofilnych. Doniesienia w przypadku wirusów choroby Aujeszky'ego są również bardzo zbliżone do tych uzyskanych w badaniach własnych. Bøtner [1991] wprowadzał te wirusy do gnojowicy i poddawał działaniu różnych temperatur. Okazało się, że w warunkach temperaturowych zbliżonych do tych, jakie były w trakcie badań własnych (35^{o}C) wirusy przeżywały 5 godz., natomiast w temperaturze wyższej o 5^{o}C – 2 godz.

FERMENTACJA W WARUNKACH TERMOFILNYCH

Kolejny etap badań wykonano w reaktorze doświadczalnym w temperaturze 55^{o}C. Fermentację beztlenową w warunkach termofilnych przeprowadzają mikroorganizmy żyjące w zakresie temperatur od 45 do 60^{o}C. Ze względu na wydajność produkcji metanu najkorzystniejszą temperaturą przebiegu procesu jest 52-55^{o}C. Fermentacja w warunkach termofilnych zapewnia również wysoki stopień sanityzacji odpadów pochodzenia zwierzęcego, gdyż w wysokiej temperaturze nieodwracalnemu uszkodzeniu ulegają aparaty enzymatyczne bakterii [Jędrczak i Haziak 2005]. Według Sahlström [2003] temperatura w granicach od 50 do 55^{o}C jest najważniejszym czynnikiem eliminującym bakterie chorobotwórcze podczas fermentacji w warunkach termofilnych. Opinię tę potwierdzają Olsen i Larsen [1987], którzy badali przeżywalność pałeczek *Salmonella* sp., *Streptococcus faecalis* i *Escherichia coli*. Uzyskali oni pełną inaktywację wszystkich badanych bakterii w ciągu 24 godzin. Badania Aitkena i wsp. [2007] także dowiodły skutecznej eliminacji pałeczek *Escherichia coli* O157:H7 podczas fermentacji termofilnej. W badaniach własnych zaszła szybka eliminacja

drobnoustrojów wskaźnikowych we wszystkich cyklach. Pałeczki *Escherichia coli* i *Salmonella* sp. ostatni raz izolowano z nośników umiejscowionych w reaktorze po 12 godzinach. Dłużej wykrywano paciorkowce, bowiem jeszcze w 30. godzinie trzeciego cyklu w nośniku kostnym. Całkowity czas przeżywania pałeczek *E. coli* wahał się w granicach 24-34 godz., pałeczek *Salmonella* sp. 24-32 godz., a paciorkowców 26-42 godz. W przeprowadzonym doświadczeniu nie stwierdzono zależności pomiędzy liczbą wyizolowanych bakterii a rodzajem zastosowanego nośnika.

Jaja *Ascaris suum* były znacznie szybciej inaktywowane w wyższej temperaturze niż w warunkach mezofilnych. Już w ciągu pierwszych sześciu godzin procesu doszło do spadku odsetka żywych jaj z 96% do 1-2%. Z prostych regresji wynika, że w 55^{o}C co godzinę liczba jaj inwazyjnych spadała o prawie 8%, co wskazuje, że przeżywały niewiele ponad 10 godzin. Pike i wsp. [1988] wykazali, że już po 15 min nie wykrywa się żywych jaj, o ile działa na nie temperatura 55^{o}C.

W trakcie fermentacji w warunkach termofilnych oba testowane wirusy poddawano odmiennym czasom ekspozycji na wysoką temperaturę, z racji ich odmiennej termooporności. Wirusy choroby Aujeszky'ego analizowano w ciągu godziny co kilka, kilkanaście minut, natomiast BPV – 5-krotnie w ciągu doby. Aktywnych cząstek wirusów chA nie wykryto już po 30 min procesu, całkowity czas przeżywania obliczono na 50 min, podczas gdy BPV wykrywane były jeszcze po 24 godz., a ich miano było mniejsze w porównaniu z próbką kontrolną średnio o 2 log. Być może dobowy cykl badawczy był zbyt krótki, aby osiągnąć wystarczający spadek miana wirusów (Rozp. Komisji nr 208/2006 [2006]). Parwowirusy bydlęce przeżywały najdłużej w dużych nośnikach (mięso, kość – ok. 70 godz.), najkrócej w postaci zawiesiny wprowadzonej bezpośrednio do biomasy reaktora (ok. 47 godz.). Wyniki dotyczące wirusa chA zbliżone są do uzyskanych w pracy Turnera i wsp. [2000], którzy porównywali przeżywalność tych mikroorganizmów na pożywkach i w gnojowicy w różnych temperaturach. Okazało się, że w 55^{o}C po raz ostatni wykryli je w piątej minucie procesu fermentacji, natomiast na pożywce przeżyły dłużej − po 15 min ich miano spadło o 2 log. Wyniki tych badań wskazują na duże znaczenie warunków fizykochemicznych w eliminacji wirusów, innych niż temperatura, generowanych w trakcie procesu fermentacji. Podobne zjawisko zaobserwowano w przypadku BPV. Literatura podaje różne wyniki ich przeżywalności w 55^{o}C w zależności od rodzaju nośnika. Wirusy wprowadzone w biomasę w probówkach przeżywały 20 godz., natomiast zaadsorbowane na filtrach – 6,25 godz. [Metzler i Pesaro 1993]. Z kolei, w pracy Hoferera [2001] BPV wprowadzone na filtrach do gnojowicy kofermentowanej z resztkami kuchennymi przeżywały, podobnie jak w zawiesinie w badaniach własnych – od 39,5 do 48,6 godz.

WŁAŚCIWOŚCI FIZYKOCHEMICZNE I BIOLOGICZNE GLEBY PO ZASTOSOWANIU „POLEPSZACZY"

Systemy uprawy roślin i nawożenie prowadzą często do niekorzystnych zmian w zakresie reprodukcji materii organicznej w glebie. Ulega ona utlenianiu i nie jest efektywnie zastępowana poprzez materię wytworzoną w systemach uprawowych, które podlegają specjalizacji i uproszczeniu do upraw monokulturowych. Wobec utrzymującej się od kilku lat tendencji ujemnego bilansu materii organicznej w glebach należałoby zmodyfikować systemy uprawy lub wprowadzić nowe źródło tej substancji [Fotyma i Kuś 1997]. Materia organiczna przyczynia się do nasilenia wzrostu i rozwoju drobnoustrojów, a są one jednym z najważniejszych czynników, kształtujących dostępność składników pokarmowych dla roślin, a więc także wpływającym na żyzność gleby [Myśków 1981, Gliński i Stępniewski 1983, Myśków i wsp. 1996]. Wyniki badań własnych wskazują, że wprowadzenie do gleby zarówno kompostu, jak i cieczy pofermentacyjnej spowodowało, w przeważającej liczbie przypadków, wzrost populacji wszystkich grup mikroorganizmów – bakterii, promieniowców i grzybów, a także wszystkich badanych grup pokarmowych drobnoustrojów. Efekt ten można tłumaczyć dopływem łatwo przyswajalnych źródeł węgla i azotu. „Polepszacze" poza tym, że wnoszą do gleby pierwiastki biogenne, są także rezerwuarem mikroorganizmów zymogennych, z dużym prawdopodobieństwem można stwierdzić, że analizy mikrobiologiczne gleby wzbogaconej o „polepszacze" dotyczyły autochtonów i zymogenów. Rozwój zymogenów uzależniony jest od dopływu z zewnątrz świeżej, łatwo przyswajalnej materii organicznej, a także od stosunków biotycznych z drobnoustrojami glebowymi. Liu i wsp. [2007] stwierdzili, że w glebach nawożonych organicznie obserwuje się nie tylko wyższy poziom węgla i azotu, ale także pierwiastków takich jak: Ca, Mg, K, Na, Mn, P, które sprzyjają rozwojowi mikroorganizmów. W badaniach własnych intensywność wzrostu i rozwoju drobnoustrojów w glebie w obecności „polepszaczy" była zależna od ich dawki oraz czasu oddziaływania na glebę. Szczególnie widać to było w przypadku drobnoustrojów celulolitycznych izolowanych z gleby z dodatkiem najwyższych dawek cieczy pofermentacyjnej. Pod koniec doświadczenia ich liczba wzrosła aż 12-16-krotnie w porównaniu z kontrolą. Podobna zależność wystąpiła w glebie z dodatkiem kompostu, jednak przyrost liczby tych bakterii był mniejszy – 2-5-krotny. Mogło to być spowodowane dodatkiem trocin do kompostowanego materiału i w związku z tym wyższym udziałem populacji bakterii celulolitycznych w glebie z kompostem niż w próbkach kontrolnych. Kofermentat w badaniach własnych zawierał domieszkę materii roślinnej, a ponieważ nie cała celuloza podlega hydrolizie w trakcie fermentacji, może ona pozostać w cieczy pofermentacyjnej. Z tego też powodu mogło dojść do zwiększenia populacji mikroorganizmów celulolitycznych w glebie wzbogaconej w ciecz pofermentacyjną. Jak wykazują wyniki badań Frąc i Jezierskiej-Tys [2008], dodanie do gleby substancji pozbawionej materii roślinnej także może spowodować przyrost populacji bakterii ce-

lulolitycznych. Autorki wprowadzały do gleby brunatnej osad ścieków mleczarskich, który przyczynił się do wzrostu liczby tej grupy mikroorganizmów. Pektyny to także jeden za składników materii roślinnej, które mogą pozostać w cieczy pofermentacyjnej czy kompoście. W badaniach własnych dodatek najwyższej dawki cieczy pofermentacyjnej do gleby spowodował 7-krotny wzrost liczby bakterii pektynolitycznych w ostatnim terminie analiz, natomiast dodatek kompostu w dawce K2 znacznie silniej stymulował przyrost populacji tych mikroorganizmów, bo aż 24-krotny. Zjawisko to wystąpiło już w pierwszym terminie analiz.

Populacja grzybów wyraźniej zwiększała się w glebie z kompostem, choć nieco niższe pH, bardziej sprzyjające ich rozwojowi, zanotowano w próbkach gleby z cieczą pofermentacyjną. Grzyby, w przeciwieństwie do bakterii, wymagają dużych ilości dostępnego węgla organicznego, który ma wysoki udział w biomasie grzybni [Cooke i Rayner 1984, Bohacz i Korniłłowicz-Kowalska 2005]. Z badań własnych wynika, że po wzbogaceniu prób glebowych „polepszaczami" doszło do wzrostu liczby grzybów, nawet 4,5-krotnego. Może to być dowodem na to, że wprowadzone substancje są dobrym źródłem węgla organicznego. Potwierdzają to wyniki badań własnych, z których wynika, że gleba wzbogacona o „polepszacze" zawiera więcej labilnego węgla organicznego, łatwo dostępnego dla komórek, niż gleba kontrolna. Do podobnych wniosków doszli Lee i wsp. [2004], którzy dodawali do gleby kompost z resztek jedzenia. Stwierdzili oni, że w glebie użyźnionej doszło do 2-3- krotnego wzrostu liczby grzybów w porównaniu z kontrolą. Zjawisko to było skorelowane z podwyższoną zawartością węgla w próbkach z kompostem. Podobne wyniki świadczące o pozytywnym wpływie dodatków do gleby na mikroorganizmy autochtoniczne otrzymano w krótkoterminowym doświadczeniu mającym na celu określenie wpływu mączki mięsno-kostnej na właściwości gleby i aktywność mikroorganizmów glebowych [Mondini i wsp. 2008]. Dwa tygodnie po zainicjowaniu eksperymentu zaobserwowano wzmożony proces mineralizacji. Wzrósł również poziom węgla i azotu w glebie. Stwierdzono podwyższoną wartość wskaźnika oddechowego mikroorganizmów autochtonicznych, wzrost ich enzymatycznej aktywności i dwukrotny wzrost populacji. W glebie stwierdzono obecność lipidów, które były dla mikroorganizmów źródłem energii. Być może podobne zjawisko miało miejsce w badaniach własnych, nie sprawdzano jednak populacji mikroorganizmów lipolitycznych.

Z badań Nowaka i wsp. [2001] wynika, że liczba promieniowców zwiększała się po zastosowaniu wyższej dawki kompostu. Zjawisko to mogło wskazywać na zaawansowanie procesu humifikacji, gdyż drobnoustroje te aktywnie uczestniczą w późniejszych etapach powstawania próchnicy glebowej. Promieniowce należą do organizmów antybiotycznych i antagonistycznych również wobec grzybów fitopatogennych, zatem wzrost ich liczby jest zjawiskiem korzystnym ze względu na zdrowotność roślin, podnosi bowiem potencjał fitosanitarny gleby. Rozwojowi promieniowców sprzyja środowisko o pH obojętnym lub alkalicznym [Lacey 1973]. Wprawdzie w badaniach własnych pH gleb na-

wożonych kompostem (6,63-6,87) było wyższe niż w glebie kontrolnej (pH 6,52), a w próbkach z cieczą pofermentacyjną było nieco niższe (6,37-6,54), to i tak doszło do zwiększenie populacji promieniowców we wszystkich próbkach. Być może jest to związane z ich dużymi zdolnościami adaptacyjnymi do różnych warunków środowiska. Według Szwed i wsp. [1999] wniesienie kompostów powstałych z pyłów tytoniowych z dodatkiem słomy lub kory drzew iglastych również spowodowało podwyższenie wartości pH gleby, co przyczyniło się do wzmożonego rozwoju bakterii i promieniowców (pH kory rośnie w czasie kompostowania nawet do wartości 7-8,5). W doświadczeniu własnym wprowadzony do gleby kompost także spowodował wzmożony rozwój większości bakterii i promieniowców. Jedynym wariantem doświadczenia, w którym nie zaobserwowano przyrostu populacji mikroorganizmów glebowych była próbka wzbogacona o ciecz fermentacyjną poddawana analizie ilościowej w kierunku oznaczenia mikroorganizmów proteolitycznych. Być może zawartość białka wnoszona wraz z „polepszaczem" była zbyt mała, aby stymulować rozwój tej grupy drobnoustrojów. Mogło dojść w tym przypadku do głodzenia energetycznego komórek i ich przekształcenia w formy karłowate. Średni czas generacji tak zmienionych bakterii może wynosić 10-20 dni. Niektóre gatunki drobnoustrojów dające się rutynowo hodować po stresie (np. głodzeniu) przestają rosnąć na pożywkach laboratoryjnych. Taki stan określa się mianem VBNC (*viable but non-culturable*) [Dahm i Strzelczyk 2004]. Być może w doświadczeniu taki stan dopiero zaczął się ujawniać i dlatego wykrywano bakterie, ale w bardzo małych ilościach. Zauważalna poprawa właściwości mikrobiologicznych, biochemicznych i chemicznych gleby może wystąpić dopiero po kilkunastu latach stosowania „polepszaczy". Krótkoterminowe, laboratoryjne badania własne nie w pełni odzwierciedlają zjawiska, które być może miałyby miejsce w wieloletnim doświadczeniu polowym, chociaż wskazują na zalety stosowania dodatków glebowych. Martyniuk i wsp. [2002] przeprowadzili 17-letnie badania polowe stosując nawożenie gleby gnojowicą, albo NPK. Po 10 latach stwierdzili znaczną poprawę mikrobiologicznych (biomasa, oddychanie, liczba), biochemicznych (aktywność dehydrogenazy i fosfataz) oraz chemicznych (zawartość C, N i pH) właściwości gleby nawożonej w porównaniu ze stosowaniem tylko NPK.

Analizując obecność poszczególnych grup drobnoustrojów w glebie można zauważyć pewne zależności. Wraz z intensywnym rozwojem promieniowców (P) i bakterii (B) maleje liczba grzybów (G) i odwrotnie – zwiększenie populacji grzybów skutkuje zmniejszeniem liczby mikroorganizmów prokariotycznych. Stosunek tej liczebności (P+B/G) określa wartość wskaźnika fitosanitarnego gleby. Jego wysokie wartości świadczą o dobrym stanie fitosanitarnym gleby i o jej żyzności. Jak wynika z badań Myśkówa [1981], w obiektach z nawożeniem organicznym wskaźnik ten przyjmował znacznie wyższe wartości niż w obiektach z nawożeniem wyłącznie mineralnym lub bez nawożenia. W badaniach własnych znajduje to potwierdzenie tylko w ostatnich terminach doświadczeń z kompostem i z cieczą pofermentacyjną. Przez pierwsze 214-258 dni od

założenia doświadczenia „polepszacze" nie wpływały na wartość wskaźnika w porównaniu z kontrolą, a nawet go obniżały, co świadczy o niezbyt dobrym stanie fitosanitarnym gleby. Być może ta sytuacja poprawiłaby się poza okresem badawczym, gdyby doświadczenie trwało kolejne lata.

Wprowadzenie do gleby kontrolnej „polepszaczy" spowodowało wzrost jej pH, który był proporcjonalny do dawki. Było to prawdopodobnie spowodowane powstaniem amoniaku w glebie w trakcie mineralizacji materii organicznej wprowadzonej z polepszaczami. Taka zależność była lepiej widoczna w próbkach z kompostem, ich odczyn wzrósł z 6,52 (kontrola) do 6,87, podczas gdy w przypadku cieczy pofermentacyjnej osiągnął maksymalną wartość rzędu 6,54. Podobne wyniki badań otrzymał Odlare i wsp. [2008], którzy przez 4 lata nawozili cieczą pofermentacyjną i kompostem poletka doświadczalne. W badaniach własnych dodatek do gleby obu typów „polepszaczy" spowodował również, proporcjonalny do dawki, wzrost zawartości węgla organicznego. Było to szczególnie widoczne w przypadku gleby z kompostem (przyrost o 0,5-2,1 $g \cdot kg^{-1}$ w porównaniu z kontrolą). Ciecz pofermentacyjna wpłynęła na zwiększenie zawartości węgla organicznego w glebie o 0,2-0,4 $g \cdot kg^{-1}$. Występowanie podobnych zależności potwierdzają badania Odlare i wsp. [2008] oraz Lee i wsp. [2004]. Zawartość kolejnego pierwiastka biogennego – azotu kształtowała się na poziomie 0,43% s.m. w kompoście i 1,67% s.m. w cieczy pofermentacyjnej. W glebie z dodatkiem różnych dawek kompostu procentowy udział azotu minimalnie wzrastał wraz z dawką „polepszacza", natomiast w przypadku zastosowania produktu fermentacji zawartość azotu ogólnego (N_{og}) nawet zmalała w porównaniu z kontrolą. Może to wynikać z faktu, że dostarczony do gleby azot organiczny ulega przemianom, w wyniku których powstają głównie azotany, które są łatwo wymywane z gleby [Scholefield i wsp. 1991, Fotyma 1996]. Azot amonowy wchodzący w skład puli azotu ogólnego może również być w procesie nitryfikacji utleniany do formy azotanowej. Jak zauważyli Czyżyk i wsp. [2011] stężenie azotu amonowego w odciekach z gleby nawożonej kompostem było na ogół większe niż azotu azotanowego. Coroczne nawożenie gleby zarówno kompostem, jak i nawozami mineralnymi spowodowało systematyczne zwiększanie się stężenia azotanów w odciekach, a tym samym ubytku azotu z gleby. W badaniach własnych próbki gleby były systematycznie nawadniane, co mogło spowodować ubytek azotu.

Mając na uwadze znaczenie fosforu dla roślin i jego obieg w przyrodzie, zwraca się coraz częściej uwagę na konieczność wtórnego włączania tego pierwiastka zawartego w odpadach do obiegu. W badaniach własnych stwierdzono, paradoksalnie, że zawartość formy przyswajalnej tego pierwiastka była znacznie mniejsza w glebie z dodatkiem kondycjonerów niż w obiekcie kontrolnym (K – 24,4 $mg \cdot 100\ g^{-1}$ s.m., a w glebach wzbogaconych – od 17,3 do 22,1 $mg \cdot 100\ g^{-1}$ s.m.). Nie wiadomo, dlaczego doszło do takiej sytuacji. Dane literaturowe podają, że nawożenie organiczne zawsze wpływa na wzrost zawartości przyswajalnych form fosforu [Spychaj-Fabisiak i wsp. 2007, Odlare i wsp. 2008]. W pracy oceniono również wpływ nawożenia otrzymanymi kondycjone-

rami na stan gospodarki węglem. Według McLauchlan i Hobbie [2004] zasoby glebowej materii organicznej można podzielić na dwie frakcje: labilną, która jest szybko rozkładana przez mikroorganizmy oraz trwałą, która ma dłuższy czas rozkładu i zawiera m.in. ligniny. Ze względu na zwiększenie aktywności mikrobiologicznej gleby, a w konsekwencji jej żyzności korzystny jest wzrost zawartości frakcji węgla labilnego. W badaniach własnych w większości przypadków zaobserwowano znaczący przyrost zawartości węgla labilnego w stosunku do obiektu nienawożonego. Szczególnie widoczne to było w glebie wzbogaconej o kompost, w której węgla labilnego było o 7-11% więcej w porównaniu z kontrolą. Pula węgla labilnego zwiększyła się o około 5% w glebie z najniższą i optymalną dawką cieczy pofermentacyjnej. Dawka F3 spowodowała spadek zawartości tej frakcji labilnej w glebie.

Badania wykazały, że odpady mięsne 3. kategorii poddane odpowiednim procesom sanityzacyjnym nie stanowią zagrożenia dla środowiska glebowego, mają wartości nawozowe i z tego też względu mogą znaleźć zastosowanie w rolnictwie.

6. WNIOSKI

1) Przeprowadzone badania potwierdziły przydatność nowatorskich metod oceny skuteczności sanityzacyjnej technologii kompostowania oraz fermentacji odpadów mięsnych 3. kategorii w trakcie trwania tych procesów, a nie jedynie opierając się na analizie materiału wejściowego i wyjściowego.
2) Monitorowanie liczby bakterii, miana wirusów i odsetka jaj inwazyjnych pasożytów w trakcie procesów sanityzacyjnych pozwoliło na przeprowadzenie statystycznych analiz i wyliczenie całkowitego czasu przeżycia mikroorganizmów i jaj oraz na określenie tempa ich eliminacji w określonym czasie.
3) Zakres inaktywacji wybranych bakterii, wirusów i jaj pasożytów w odpadach mięsnych był zróżnicowany i zależał od typu procesu, a zwłaszcza od wartości temperatury. Najszybsza inaktywacja badanych organizmów miała miejsce w trakcie fermentacji w warunkach termofilnych, najwolniejsza – w procesie kompostowania.
4) Wielkość nośnika, a więc stopień rozdrobnienia odpadów nie miał wpływu na skuteczność sanityzacyjną testowanych technologii kompostowania i fermentacji. Dlatego uznano, że wymagania zawarte w Rozporządzeniu nr 1774/2002 i 1069/2009 Parlamentu Europejskiego są zbyt restrykcyjne w odniesieniu do wielkości odpadów.
5) W trakcie kompostowania i fermentacji osiągnięta została pożądana redukcja liczby *Enterococcus faecalis* i *Salmonella* Senftenberg W_{775} o 5 cykli log oraz spadek miana BPV o co najmniej 3 cykle log we wszystkich nośnikach, dlatego też produkty finalne mogą zostać wykorzystane do celów nawozowych.
6) Wprowadzenie do gleby produktów finalnych kompostowania i fermentacji powodowało zwiększenie populacji większości grup mikroorganizmów glebowych i wzrost wartości wskaźnika fitosanitarnego.
7) Dodatek do gleby „polepszaczy" spowodował wzrost zawartości węgla organicznego, a także znaczący przyrost zawartości węgla labilnego, który przyczynia się do podniesienia żyzności gleby. Nie doszło jednak do zwiększenia puli azotu ogólnego i przyswajalnej formy fosforu.
8) Produkty finalne, otrzymane w wyniku kompostowania i fermentacji biomasy zawierającej odpady mięsne 3. kategorii, mają pozytywny wpływ na właściwości fizykochemiczne i mikrobiologiczne, a w konsekwencji żyzność gleb i nie stanowią zagrożenia sanitarnego.

LITERATURA

[1] Aarestrup F.M., 1995. Occurence of glycopeptide resistance among *Enterococcus faecium* isolates from conventional and ecological poultry farms. Microbiol. Drugs Resist. 1, 255-257.

[2] Aitken D.M., Mark D.S, Van Abel N.A., Blauth K.E., Singleton D.R., Crunk P.L., Nichols C., Walters G.W., Schneider M., 2007. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 during thermophilic anaerobic digestion of manure from dairy cattle. Wat. Res. 41, 1659-1666.

[3] Avnimelech Y., Cohen A. Shkedy D., 1993. Can we expect a consistent efficiency of municipal waste compost application? Compost Sci. Utiliz. 1, 7-14.

[4] Babich H., Stotzky G., 1979. Differential toxicities of mercury to bacteria and bacteriophages in sea and in lake water. Can. J. Microbiol. 25, 1252-1257.

[5] Bates J., Jordens J.Z., Griffithis D.T., 1995. Farm animals as putative reservoir for vancomycin-resistant enterococcal infection in man. Antimicrob. Agents Chemother. 39, 781-785.

[6] Bendixen H.J., 1997. Hygiene and sanitation requirements in Danish Biogas Plants. [In:] The Future of Biogas in Europe, ed. J.B. Holm-Nielson, BioPress, Risskov, Denmark 50-58.

[7] Bergstrom K., Langeland G., 1981. Survival of Ascaris eggs, Salmonella and fecal coli soil and on vegetables grown in infected soil. Nord. Vet-Med. 33, 23-32.

[8] Biermann U., Herbst W., Krauss H., Schliesser Y., 1989. Elektronenmikroskopische Nachweisrate enteraler Viren bei Durchfallkrankheiten von Hund, Katze, Kalb, Schwein und Fohlen im Jahr 1988. Elektronenmikroskopische Untersuchungsbefunde. Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr 102(12), 412-414.

[9] Bilitewski B., Hardtle G., Marek K., 2003. Podręcznik gospodarki odpadami. Teoria i praktyka. Wyd. Seidel-Przywecki, Sp. z o.o. Warszawa.

[10] Blair G.J., Lefroy R.D.B., Lisle L., 1995. Soil carbon fractions based on their degree of oxidation, and the development of a carbon management index for agricultural systems. Crop Pastur. Sci. 46, 1459-1466.

[11] Boch J., Supperer R., 1983. Veterinärmedizinische Parasitologie. Paul Parey Berlin and Hamburg.

[12] Boguszewska J., 1980. Isolation and some properties of extracellular amylases of *Fusarium martii*. Acta Mycol.16, 237-245.

[13] Bohacz J., Korniłłowicz-Kowalska T., 2005. Wpływ kompostów keratynowo-korowych i keratynowo-koro-słomowych na rozwój bakterii i grzybów w dwóch glebach różniących się systemem uprawy roślin. Zesz. Probl. Post. Nauk Rol. 506, 55-64.

[14] Böhm R., 2002. Hygienic safety in organic waste management. Proceedings of the 10th international Conference of the RAMIRAN Network, Štrbskiè Pleso, 17-30.

[15] Böhm R., 2004. What need for specific rules for composting of biowaste and catering waste. European Food Safety Authority. Working Group on Animal By-Products Brussels.

[16] Bøtner A., 1991. Survival of Aujeszky's disease virus in slurry at various temperatures. Vet. Microbiol. 29(3-4), 225-35.

[17] Budzińska K., Jurek A., 2003. Kompleksowa analiza bakteriologiczna ścieków z zakładów mięsnych. Ekol. Techn. 6, 3-12.

[18] Carrington E.G., Pike E.B., Auty D., Morris R., 1991. Destruction of faecal bacteria, enteroviruses and ova of parasites in wastewater sludge by aerobic thermophilic and anaerobic mesophilic digestion. Water Sci. Technol. 24, 377-380.
[19] Ceustermans A., De Clercq D., Aersten A., Michiels C., Coosemans J., Ryckeboer J., 2007. Inactivation of Salmonella senftenberg strain W 775 during composting of biowastes and garden wastes. J. Appl. Microbiol. 103(1), 53-64.
[20] Cooke R.C., Rayner A.D.M., 1984. Ecology of Saprotrophic Fungi. (eds.p). Longman Group London New York 1984.
[21] Cote C., Masse D.I., Quessy S., 2005. Reduction of indicator and pathogenic microorganisms by psychrophilic anaerobic digestion in swine slurries. Bioresource Technol. 97, 686-691.
[22] Czekała J., Dach J., Wolna-Maruwka A., 2006.Wykorzystanie bioreaktora do badań modelowych kompostowania osadu ściekowego. Woda-Środowisko-Obszary Wiejskie 6, 2(18), 29-40.
[23] Czyżyk F., Pulikowski K., Strzelczyk M., Pawęska K., 2011. Wymywanie mineralnych form azotu z gleby lekkiej nawożonej corocznie kompostem z osadów ściekowych i nawozami mineralnymi. Woda-Środowisko-Obszary Wiejskie 11, 4(36), 95-105.
[24] Dach J., Jędruś A., Adamski J., Kowalik I., Zbytek Z., 2003. Bioreaktor do badań procesów rozkładu materiałów organicznych. J. Res. Appl. Agric. Engng 48(4), 74-77.
[25] Dahm H., Strzelczyk E., 2004. Żyjące, lecz nie dające się hodować bakterie. Post. Mikrobiol. 43(3), 251-265.
[26] Deng M.Y., Cliver D.O., 1995. Antiviral effects of bacteria isolated from manure. Microb. Ecol. 30, 43-54.
[27] Downes F.P, Ito K., 2001. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 4th edition, American Public Health Association, Washington.
[28] Doyle M.P., Schoeni J.L., 1987. Isolation of Escherichia coli O157:H7 from retail fresh meat and poultry. Appl. Environ. Microbiol. 53, 2394-2396.
[29] Epstein E., 1997. The Science of Composting. Lewis Publishers CRC Press, Inc., Boca Raton Florida.
[30] Eriksen L., 1990. Ascaris suum: influence of egg density on in vitro development from embryonated egg to infective stage. Acta Vet. Scand. 31, 489-491.
[31] Farez S., Morley R.S., 1997. Potential animal health hazards of pork and pork products. Rev. Sci. Tech. 16, 75-78.
[32] Feachem R.G., Bradley D.J., Garelick H., Mara D.D., 1978. Health aspects of excreta and wastewater management. The World Bank Washington D.C. 204, 1-33.
[33] Feachem R., Bradley D., Garelick H., Mara D., 1983. Sanitation and Disease: Health Aspects of Excreta and Wastewater Management. John Wiley Chichester, 1-501.
[34] Fotyma E., 1996. Zastosowanie metody N min. Do oceny środowiskowych skutków nawożenia azotem. Zesz. Problem. Post. Nauk Rol. 440, 89-99.
[35] Fotyma M., Kuś J., 1997. Oddziaływanie rolnictwa na środowisko glebowe. Mat. Konf. Nauk. Ochrona i wykorzystanie przestrzeni produkcyjnej Polski, Puławy, Wyd. IUNG Puławy 12(1), 155-171.

[36] Frąc M., Jezierska-Tys S., 2008. Zmiany aktywności mikrobiologicznej gleby brunatnej pod uprawą pszenicy ozimej w różnych latach oddziaływania osadu z oczyszczalni ścieków mleczarskich. Ann. UMCS, sec. E, Agricultura LXIII(1), 118-132.
[37] Gadre R.V., Ranade D.R., Godbole S.H., 1986. A note on survival of salmonellas during anaerobic digestion of cattle dung. J. Appl. Microbiol. 60, 93-96.
[38] Gale P., 2004. Risks to farm animals from pathogens in composted catering waste containing meat. Vet. Rec. 155, 77-82.
[39] Gantzer C., Gaspard P., Galvez L., Huyard A., Dumouthier N., Schwartzbrod J., 2001. Monitoring of bacterial and parasitological contamination during various treatment of sludge. Wat. Res. 35(16), 3763-3770.
[40] Glass K.A., Loffelholz J.M., Ford J.P., Doyle M.P., 1992. Fate of Escherichia coli O157:H7 as affected by pH or sodium chloride and in fermented, dry sausage. Appl. Environ. Microbiol. 58, 2513-2516.
[41] Gliński J., Stępniewski W., 1983. Pobieranie tlenu i wydzielanie dwutlenku węgla w środowisku glebowym. Probl. Agrofiz. 39, 3-72.
[42] Golueke C.G., 1974. Biological reactions in solid waste recovery systems. Compost Sci. 15, 2-6.
[43] Grant S.B., Pendroy C.P., Mayer C.L., Bellin J.K., Palmer C.J., 1996. Prevalence of Enterohemorrhagic Escherichia coli in Raw and Treated Municipal Sewage. Appl. Environ. Microbiol. 62(9), 3466-3469.
[44] Hamer G., 2003. Solid waste treatment and disposal: effect on public health and environmental safety. Biotechnol. Adv. 22, 71-79.
[45] Hankin L., Zucker M., Sands D.C., 1971. Improved solid medium for the detection and enumeration of pectolytic bacteria. Appl. Microbiol. 22, 205-209.
[46] Harrison W.A., Griffith C.J., Tennant D., Peters A.C., 2001. Incidence of Campylobacter and Salmonella isolated from retail chicken and associated packaging in South Wales. Lett. Appl. Microbiol. 33, 450-454.
[47] Haug R.T., 1993. The Practical Handbook of Compost Engineering. Lewis Publishers CRC Press, Inc., Boca Raton Florida.
[48] Hoferer M., 2001. Seuchenhygienische Untersuchungen zur inactivierung ausgewählter Bakterien und Viren bei der mesophilen und termophilen anaetoben alkalischen Faulung von Bio- und Küchenabfällen sowie anderen rest- und Abfallstoffen Tierischer Herkunft. D188 (Diss. Freie Universität Berlin). Shaker Verlag Aachen.
[49] Hoitink H.A.J., Inbar Y., Boehm M.J., 1991. Status of compost-amended potting mixes naturally suppressive to soilborne diseases of floricultural crops. Plant Disease 75, 869-873.
[50] Hurst C.J., Gerba C.P., Cech I., 1980. Effects of environmental variables and soil characteristics on virus survival in soil. Appl. Environ. Microbiol. 40, 1067-1079.
[51] Jepsen S.E., Krause M., Grüttner H., 1997. Reduction of fecal Streptococcus and Salmonella by selected treatment methods for sludge and organic waste. Wat. Sci. Technol. 36(11), 203-210.
[52] Jędrczak A., 2007. Biologiczne przetwarzanie odpadów. Wyd. Naukowe PWN Warszawa.
[53] Jędrczak A., Haziak K., 2005. Określenie wymagań dla kompostowania i innych metod biologicznego przetwarzania odpadów. Opracowanie na zamówienie Ministra Środowiska, Zielona Góra), http://www.toensmeier.pl/

[54] Johnson P.W., Dixon R., Ross A.D., 1998. An in-vitro test for assessing the viability of Ascaris summ eggs exposed to various sewage treatment processes. Int. J. Parasitol. 28**,** 627-633.
[55] Joshua R.S., Macauley B.J., Hiu-Soti C.R., 1994. Recycling grease trap sludges. Biocycle. 35, 46-47.
[56] Juris P., Tóth F, Lauková A., Plachý P., Dubinský P., Sokol J., 1996. Survival of model bacterial strains and helminth eggs in the course of mesophilic anaerobic digestion of pig slurry. Vet Med. 41(5), 149-53.
[57] Kärber G., 1931. Beitrag zur kollektiven behandlung pharmakologischer reihenversuche. Arch. Exp. Pathol. Pharmacol. 162, 480-483.
[58] Kasza L., Shadduck J.A., Christofinis G.J., 1972. Establishment, viral susceptibility and biological characteristics of a swine kidney cell line SK-6. Res. Vet. Sci. 13, 46-51.
[59] Kelly W.R., 1978. Animal and human health hazards associated with the utilization of animal effluents. Commission of the European Communities, EUR 6009 EN, ESCS--EEC-EAEC Brussels-Luxembourg.
[60] Koch K., Strauch D., 1981. Removal of Polio- and Parvovirus in Sewage-Sludge by Lime-Treatment. Zbl. Bakt. Hyg. 174, 335-347.
[61] Kopeć M., Gondek K., 2001. Nawozowe zagospodarowanie odpadów. Wyd. Uniwersytetu Rolniczego Kraków.
[62] Lacey J., 1973. Actinomycetes in soils, compost and fodders. [In:] Actinomycetales. Characteristic and practical importance. New York: Academic Press, 231-251.
[63] Lapidot A., Romling U., Yaron S., 2006. Biofilm formation and the survival of Salmonella typhimurium on parsley. Int. J. Food Microbiol. 109, 229-233.
[64] Larski Z. 1982, Wirusologia weterynaryjna. PWRiL Warszawa.
[65] Ledakowicz S., Krzystek L., 2005. Wykorzystanie fermentacji metanowej w utylizacji odpadów przemysłu rolno-spożywczego. Biotechnol. 3(70), 165-183.
[66] Lee J., Park R., Kim Y., Shim J., Chae D., Rim Y., Sohn B., Kim T., Kim K., 2004. Effect of food waste compost on microbial population, soil enzyme activity and lettuce growth. Bioresource Techn. 93(1), 21-28.
[67] Lipowski A. 1992, Znaczenie gospodarcze choroby Aujeszky'ego. Medycyna Wet. 48, 339-341.
[68] Lipowski A., Pejsak Z., 1996. Choroba Aujeszky'ego – znana i nieznana. Med. Wet. 52, 490-494.
[69] Liu Bo, Cong Tu, Shuijin Hu, Gumpertz M., Ristaino J.B., 2007. Effect of organic, sustainable, and conventional management strategies in grower fields on soil physical, chemical, and biological factors and the incidence of Southern blight. Appl. Soil Ecol. 37, 202-214.
[70] Lund B., Jensen V.F., Have P., Ahring B., 1996. Inactivation of virus during anaerobic digestion of manure in laboratory scale biogas reactors. Anton. Leeuw. 69, 25-31.
[71] Lund E., Nissen B., 1983. The survival of enteroviruses in aerated and unareated cattle and pig slurry. Agr. Wastes 7, 221-233.
[72] Lund E., Ronne V., 1973. On the isolation of virus from sewage treatment plant sludges. Water Res. 7, 863-871.
[73] Łoginow W., Wiśniewski W., Gonet S.S., Cieścińska B., 1993. Testowa metoda oceny podatności na utlenianie materii organicznej gleb. Zesz. Probl. Post. Nauk Rol. 411, 207-212.

[74] Mahnel H., 1983. Desinfektion von Virus. Zbl. Vet. Med. 30, 81-96.
[75] Martin J.P., 1950. Use of acid rose bengal and streptomycin in the plane method for estimating soil fungi. Soil Sci. 69, 215-232.
[76] Martyniuk S., Stachyra A., Gajda A., 2002. Long-Lasting Beneficial Effects of Slurry Application on Some Microbial and Biochemical Characteristics of Soil. Pol. J. Environ. Stud. 11(6), 727-730.
[77] Mazur T., Maćkowiak Cz., 1978. Nawożenie gnojowicą. PWRiL Warszawa.
[78] McLauchlan K.K., Hobbie S.E., 2004. Comparison of labile soil organic matter fractionation techniques. Soil Sci. Soc. Am. J. 68, 1616-1625.
[79] Metzler A., Pesaro F., 1993. Sprawozdanie końcowe z projektu: Human-, tier- und pflanzenpathogene Keime in der Feststoffvergärung. Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Zürich.
[80] Mondini C., Cayuela M.L., Sinicco T., Sanchez M., Sanchez-Monedero M.A., Bertolone E., Bardi L., 2008. Soil application of meat and bone meal. Short-term effects on mineralization dynamics and soil biochemical and microbiological properties. Soil Biol. Biochem. 40(2), 462-474.
[81] Monteith H.D., Shannon E.E., 1986. The inactivation of bovine enterovirus and a bovine parvovirus in cattle manure by anaerobic digestion, heat treatment, gamma irradiation, ensilage and composting. J. Hyg. Camb. 97, 175-184.
[82] Myśków W., 1981. Próby wykorzystania wskaźników aktywności mikrobiologicznej do oceny żyzności gleby. Postępy Mikrobiol. 20, 173-192.
[83] Myśków W., Stachyra A., Zięba S., Wasiak D., 1996. Aktywność biologiczna gleby jako wskaźnik jej żyzności i urodzajności . Rocz. Glebozn. 47(1/2), 89-99.
[84] Noble W.C., Virani Z., Cree R.G.A., 1992. Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from Enterococcus faecalis NCTC 12201 to Staphylococcus aureus. FEMS Microbiol. Lett. 93, 195-198.
[85] Nowak A., Przybulewska K., Szopa E., 2001. Wpływ nawożenia kompostami z osadów ściekowych na liczebność niektórych grup mikroorganizmów glebowych. Zesz. Probl. Post. Nauk Rol. 477, 443-449.
[86] Nørrung B., Andersen J.K., Buncic S., 2009. Main concerns of pathogenic microorganisms in meat. [In:] Safety of Meat and Processed Meat, Toldra F. (eds.), Springer.
[87] Nørrung B., Buncic S., 2008. Microbial safety of meat in the European Union. Meat Sci. 78, 14-24.
[88] Odlare M, Pell M, Svensson K., 2008. Changes in soil chemical and microbiological properties during 4 years of application of various organic residues. Waste Manag. 8 (7), 1246-53.
[89] Oksanen A., Eriksen L., Roepstorff A., Ilsoe B., Nansen P., 1990. Embryonation and infectivity of Ascaris suum eggs. A comparison of eggs collected from worm uteri with eggs collected from pig faeces. Acta Vet. Scand. 31, 393-398.
[90] Olsen J.E., Larsen H.E., 1987. Bacterial decimation times in anaerobic digestion-of animal slurries. Biol. Waste 21, 153-168.
[91] Olson M.E., 2003. Human and Animal Pathogens in Manure. Microbiology and Infectious Diseases University of Calgary.
[92] Paluszak Z., Bauza-Kaszewska J., Ligocka A., 2003. Przeżywalność pałeczek Salmonella senftenberg W_{775} w osadach pościekowych poddanych procesowi kompostowania. Med. Wet. 59(3), 239-242.

[93] Pike E.B., Carrington E.G., Harman S.A., 1988. Destruction of Salmonella, enteroviruses and ova of parasites in wastewater sludge by pasteurisation and anaerobic digestion. Water Sci. Technol. 20, 337-343.
[94] Plym-Forshell L., 1995. Survival of Salmonellas and Ascaris suum eggs in a thermophilic biogas plant. Acta Vet. Scand. 36, 79-85.
[95] Polska Norma PN-EN ISO 6579:2003/A1:2007 Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda wykrywania *Salmonella* spp. Załącznik D.
[96] Pochon J., Tradieux P., 1962. Tecnique d'Analyse en Microbiologie du Sol. Ed. De la Tourelle St. Mande.
[97] Pohlig-Schmitt M., 1987. Seuchenhygienische Untersuchungen bei der thermophilen und mesophilen anaeroben alkalischen Faulung von kommunalen Klärschlämmen. Agr. Diss. Universität Hohenheim.
[98] Rapp A., 1995. Hygenisch-mikrobiologische Untersuchungen zum Verhalten von ausgewählten Bakterien und Viren während der längerfristigen Speicherung von Flüssigmist in Güllegemeinschaftsanlagen Diss. Universität Hohenheim.
[99] Reimers R.S., Little M.D., England F.A.J., Leftwich D.B., Bowman D.D., Wilkinson R.F., 1981. Parasites in southern sludges and disinfection by standard sludge treatment. Raport US EPA 600/S2-81-166.
[100] Rocznik statystyczny, 2006. Ochrona środowiska. Informacje i opracowania statystyczne. GUS Warszawa.
[101] Roediger M., 1985. Vergleich verschiedener Verfahren zur Stabilisierung und Hygienisierung von Klärschlammen. Kommunalwirtschaft 9, 298-304.
[102] Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1774/2002 z dnia 3 października 2002 r. ustanawiające przepisy zdrowotne związane z ubocznymi produktami zwierzęcymi nie przeznaczonymi do spożycia przez ludzi.
[103] Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1069/2009 z dnia 21 października 2009 r. określające przepisy sanitarne dotyczące produktów ubocznych pochodzenia zwierzęcego, nie przeznaczonych do spożycia przez ludzi, i uchylające rozporządzenie (WE) nr 1774/2002 (rozporządzenie o produktach ubocznych pochodzenia zwierzęcego).
[104] Rozporządzenie Komisji (WE) nr 208/2006 z dnia 7 lutego 2006 r. zmieniające załączniki VI i VIII do rozporządzenia (WE) nr 1774/2002 Parlamentu Europejskiego i Rady w zakresie norm przetwarzania dla wytwórni biogazu i kompostowni oraz wymagań dotyczących obornika. Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej, L 36/25.
[105] Rozporządzenia Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 23 października 2003 w sprawie warunków weterynaryjnych mających zastosowanie do niejadalnych produktów zwierzęcych oraz materiałów niskiego, wysokiego i szczególnego ryzyka (Dz.U. Nr 180, poz. 1767).
[106] Rozporządzenia Ministra Środowiska z dnia 27 września 2001 r. w sprawie katalogu odpadów, przypisy dolne nr 3 i 4 (Dz.U. Nr 112, poz. 1206).
[107] Rozporządzenia Ministra Środowiska z dnia 1 sierpnia 2002 r. w sprawie komunalnych osadów ściekowych (Dz.U. Nr 134, poz. 1140 Sprostowanie: Dz.U. Nr 155, poz. 1299).
[108] Rubin, A.R., 1996. Is Time-Temperature Really Important? The 10th Annual WEF Residuals & Biosolids Management Conference, Denver, Colorado (www.rdptech.com/technical-resources/biosolids-stabilization-systems/time-temperature-class-a-biosolids-rubin.pdf).

[109] Ruitshauser U.P., Metzler A.E., Corboz L., Wyler R., 1984. Häufigkeit des Virusnachweises in Kotproben von Schweinen mit Durchfall einschliesslich Steatorrhöe. Schweiz. Arch. Tierheilk. 126, 453-466.
[110] Rückert V., 1991. Microbiologische Untersuchungen zur Aeroben und Anaeroben Flüssigmistbehandlung. Diss. Universität Hohenheim.
[111] Sahlström L., 2003. A review of survival pathogenic bacteria in organic waste used in biogas plants. Bioresource Technol. 87,161-166.
[112] Sanders D.A., Malina J.F., Moore B.E., Sagik B.P., Sorber C.A., 1979. Fate of poliovirus during anaerobic digestion. J. Water Pollut. Control Fed. 51, 333-343.
[113] Satriana M.J., 1974. Large scale composting. Noyes Data Corporation, Park Ridge New Jersey.
[114] Scholefield D., Lockyer D. R., Whitehead D.C., Tyson K.C., 1991. A model to predict transformations and losses of nitrogen in UK pastures grazed by beaf cattle. Plant and Soil. 132(2), 165-171.
[115] Schrammek E., Sauerwald M., 1983. Hygienische Beschaffenheit von Müll-bzw. Müll/Klärschlammkomposten aus den Werken in Ennepetal. Duisburg und Lemgo Gutachten des Hyg.-Instituts des Ruhrgebiets Gelsenkirchen.
[116] Seidel K., 1983. Seuchenhygienische Probleme des Abwassers unter besonderer Berücksichtigung humanpathogener Viren. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B(178), 98-110.
[117] Shaban A.M., 1999. Bacteriological evaluation of composting systems in sludge treatment. Wat. Sci. Technol. 40(7), 165-170.
[118] Smith S.R., Lang N.L., Cheung K.H.M., Spanoudaki K., 2005. Factors controlling pathogens destruction during anaerobic digestion of biowastes. Waste Manage. 25, 417-425.
[119] Sobczak E., Duszkiewicz W., Grzybowski R., 1978. Theory and laboratory on general and technical microbiology. Skrypt SGGW-AR Warszawa.
[120] Spillmann S.K., Traub F., Schwyzer M., Wyler R., 1987. Inactivation of animal viruses during sewage sludge treatment. Appl Environ Microbiol. 53(9), 2077-2081.
[121] Spychaj-Fabisiak E., Kozera W., Majcherczak E., Balcewicz M, Knapowski T., 2007. Oddziaływanie odpadów organicznych i obornika na żyzność gleby lekkiej. Acta Sci. Pol., Agricultura 6(3), 69-76.
[122] Stelmachowski M., Jastrzębska M., Zarzycki R., 2003. In-vessel composting for utilizing of municipal sewage-sludge. Appl. Energy 75, 249-257.
[123] Stosor V., Peterson L.R., Postelnick M., Noskin G.A., 1998. Enterococcus faecium bacteremia. Arch. Intenia. Med. 158, 522-527.
[124] Strauch D., 1991. Survival of pathogenic micro-organisms and parasites in excreta, manure and sewage sludge. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 10(3), 813-846.
[125] Strauch D., 1993. Przeżywalność drobnoustrojów chorobotwórczych i pasożytów w wydalinach, nawozie i szlamie ściekowym. Med. Weter. 49(2), 59-65.
[126] Strauch D., Berg T.H., Fleischle W., 1980. Microbiologische Untersuchungen zur Hygienisierung von Klärschlamm. 3 Mitteilung: Versuche bei der Mietenkompo-stierung von Stroh mit Faulschlamm gwf-wasser/abwasser 121, 298-301.
[127] Strzelczyk E., Szpotański T., 1989. Cellulolytic and pectolytic activity of streptomycetes isolated from root-free soil, rhizosphere and mycorrhizosphere of pine (*Pinus sylvestris* L.). Biol. Fertil. Soils 7(4), 365-369.

[128] Szejniuk B., Paluszak Z., Olszewska H., Kluczek J. 1999, Przeżywalność drobnoustrojów wskaźnikowych *Salmonella enteritidis* w procesie utylizacji odpadów miejskich. Rocz. Nauk. Zoot. 26(3), 287-295.
[129] Szwed A., Korniłowicz-Kowalska T., Jezierska-Tys S., 1999. Rozwój bakterii i promieniowców oraz ich aktywność w glebach wzbogaconych kompostami. Folia Univ. Agric. Stein, Agric. 77(200), 367-372.
[130] Traub F., Spillmann S.K., Wyler R., 1986. Method for determining virus inactivation during sludge treatment processes. Appl Environ Microbiol. 52(3), 498-503.
[131] Turner C., 2002. The thermal inactivation of Escherichia coli in straw and pig manure. Bioresource Technol. 84, 57-61.
[132] Turner C., Williams S.M., Burton C.H., Cumby T.R., 2000. The inactivation of foot and mouth disease, Aujeszky's disease and classical swine fever viruses in pig slurry. J. Appl. Microbiol. 89, 760-767.
[133] Turner C., Williams S.M., Burton C.H., Cumby T.R., Wilkinson P.J., Farrent J.W., 1999. Pilot scale thermal treatment of pig slurry for the inactivation of animal virus pathogens. J. Environ. Sci. Health, 34(6), 989-1007.
[134] Ustawa z dnia 10 lipca 2007 r. o nawozach i nawożeniu (Dz.U. Nr 147, poz. 1033).
[135] Ustawa z dnia 27 kwietnia 2001 r. o odpadach (Dz.U. 2001 Nr 62 poz. 628).
[136] Ustawa z dnia 27 kwietnia 2001 r. o odpadach. Dz.U. Nr 62, poz. 628 z późn. zm., tekst jednolity z dnia 14 września 2010 r., Dz.U. Nr 185, poz. 1243.
[137] Veerannan K.M., 1977. Some experimental evidence on the viability of Ascaris lumbricoides ova. Curr. Sci. 46, 386 - 387.
[138] Von der Heide G., 1973. Ausarbeitung standardisierter labormäβiger Prüfmethoden für parasitizide Desinfektionsmittel. Vet. Med. Diss. Hannover.
[139] Wade J.J., 1997. Enterococcus faecium in Hospitals. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 16, 113-119.
[140] Walter-Matsui R., 1978. Physikalische und biochemische Wirkungen einer Rinden-Klärschlamm-Kompostierung auf pathogene Darmbakterien und Escherichia coli. Diss. Universität Gieβen.
[141] Wang G., Zhao T., Doyle M.P., 1996. Fate of enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 in bovine feces. Appl. Environ. Microbiol. 62(7), 2567-2570.
[142] Ward R.L., Ashley C.S., 1977. Identification of the virucidal agent in wastewater sludge. Appl. Environ. Microbiol. 33(4), 860-864.
[143] Ward R.L., Ashley C.S., 1978. Comparative effects of ammonia and related compounds on poliovirus. Appl. Environ. Microbiol. 36(1), 989-1007.
[144] Ward R.L., Ashley C.S., 1980. Effects of wastewater sludge and its detergents on the stability of rotavirus. Appl. Environ. Microbiol. 39, 1154-1158.
[145] Watanabe H., Kitamura T., Ochi S., Ozaki M., 1997. Inactivation of pathogenic bacteria under mesophilic and thermophilic conditions. Water Sci. Technol. 36, 25-32.
[146] Wekerle J., Saier M., Strauch D., 1987. Thermoinaktivierung von Viren im Klärschlamm. Forum Städte-Hygiene 38, 44-46.
[147] Wichuk K.M., McCartney D., 2007. A review of the effectiveness of current time-temperature regulations on pathogen inactivation during composting. J. Environ. Eng. Sci. 6(5), 573-586.
[148] Witte W., Wirth R., Klare I., 1999. Enterococci. Chemotherapy 45, 135-145.
[149] Zhang W., Dick W.A., Hoitink H.A.J., 1996. Compost-Induced Systemic Acquired Resistance in Cucumber to Pythium Root Rot and Anthracnose. Phytopathology 86, 1066-70.

OPRACOWANIE MIKROBIOLOGICZNYCH METOD MONITOROWANIA PROCESÓW SANITYZACJI ODPADÓW MIĘSNYCH PRZEZNACZONYCH DO CELÓW ROLNICZYCH

Streszczenie

Celem pracy było bezpieczne dla środowiska zagospodarowanie niejadalnych produktów odzwierzęcych 3. kategorii poprzez wykorzystanie ich do wytwarzania środków poprawiających właściwości gleb. Odpady mięsne mają wysoką wartość nawozową, jednak mogą zawierać patogeny, głównie pochodzenia jelitowego oraz jaja pasożytów. Z tego też powodu powinny być poddane sanityzacji. W pracy przetestowano trzy technologie: kompostowanie bębnowe, kofermentację beztlenową odpadów i gnojowicy w warunkach mezofilnych i termofilnych w aspekcie inaktywacji patogenów przy ekstremalnie wysokiej kontaminacji materiału biologicznego. Dokonano tego poprzez pośrednią kontrolę procesu na podstawie badania przeżywalności *Escherichia coli*, *Salmonella* Senftenberg W_{775}, paciorkowców kałowych, wirusów choroby Aujeszky'ego, bydlęcych parwowirusów (BPV), a także jaj *Ascaris suum*. Wprowadzano je w biomasę urządzeń w specjalnych nośnikach imitujących odpady odzwierzęce o różnym stopniu rozdrobnienia i badano stopień ich inaktywacji w trakcie procesów sanityzacji. W dalszej części badań określono wpływ produktów finalnych obu technologii na właściwości fizykochemiczne i mikrobiologiczne gleby. Zakres sanityzacji odpadów był zróżnicowany i zależał głównie od wartości temperatury uzyskiwanej w poszczególnych technologiach. Sanityzacja odpadów najszybciej zachodziła w trakcie fermentacji beztlenowej w warunkach termofilnych i mezofilnych, wolniej zaś w procesie kompostowania, zwłaszcza w przypadku braku wyraźnej fazy termofilnej. Wielkość nośnika odegrał w procesie inaktywacji patogenów mniejszą rolę niż zakładano. Wprowadzenie do gleby obu kondycjonerów spowodowało niewielki wzrost zawartości substancji organicznej w glebie. Zawartość azotu ogółem nieznacznie wzrosła w próbach z kompostem, natomiast dodatek cieczy pofermentacyjnej spowodował niewielkie obniżenie jego zawartości. W obiekcie kontrolnym zmiany w dynamice węgla glebowego były wolniejsze niż w obiektach nawożonych. Najwyższą zawartość węgla organicznego stwierdzono w glebie z najwyższą dawką kompostu. Zaobserwowano również w tym obiekcie znaczący przyrost zawartości węgla labilnego. Wniesienie kompostu i cieczy pofermentacyjnej spowodowało wzrost populacji prawie wszystkich grup mikroorganizmów. Badania pokazały, że w trakcie trwania procesów sanityzacyjnych, którym poddawane są odpady mięsne 3. kategorii dochodzi do redukcji liczby patogennych bakterii wirusów i jaj pasożytów do poziomu bezpiecznego dla ludzi i zwierząt. Produkty finalne są bogate w wartości nawozowe i mogą znaleźć zastosowanie w rolnictwie.

WORKING OUT MICROBIOLOGICAL METHODS FOR MONITORING SANITIZATION PROCESSES OF MEAT WASTES INTENDED FOR AGRICULTURAL PURPOSES

Summary

The aim of this study was the management of inedible animal by-products of 3 category safe to the environment, by their application to make the agents improving the soil properties. Meat wastes have a high fertilization value, but they may contain pathogens, mainly of intestinal origin, and eggs of parasites. For that reason they should be subject to sanitization. In this study three technologies were tested: drum composting and anaerobic co-fermentation of wastes and slurry under mesophylic and thermophylic conditions in the aspect of pathogen inactivation at the extremely high contamination of the biological material. This was accomplished by the indirect control of the process based on the study of survival rate of *Escherichia coli*, *Salmonella* Senftenberg W_{775}, faecal streptococci, viruses of Aujeszky disease, bovine parvoviruses (BPV) and eggs of *Ascaris suum*. They were introduced into the biomass of facilities in special carriers imitating animal wastes with various degree of fragmentation and a degree of their inactivation during sanitization processes was investigated. In the further part of the study, the effect of final products of both technologies on physicochemical and microbiological soil properties was determined. The range of waste sanitization was differentiated and depended mainly on the temperature obtained in particular technologies. Waste sanitization occurred with the highest rate during anaerobic fermentation under thermophylic and mesophylic conditions, and slower in the process of composting, particularly in the case of lack of the distinct thermophylic phase. The size of carrier played smaller role in the process of pathogen inactivation than it had been assumed. Introducing both conditioners into soil caused a small increase in the content of organic substance in soil. Total nitrogen content increased slightly in the samples with compost, whereas an addition of fermentat caused a slight decrease in its content. In the control treatment, changes in the dynamics of soil carbon were slower than in fertilized treatments. The highest content of organic carbon was observed in soil with the largest dose of compost. Also on that treatment a considerable increase in content of labile carbon was observed. Introduction of compost and fermentat resulted in an increase in populations of all groups of microorganisms. The study indicated that sanitation processes of meat waste lead to reduction in the number of pathogenic bacteria, viruses and eggs of parasites. Final products are safe for human and animal health and rich in fertilization values and can be applied in agriculture.