

НОВЫЕ БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ШТАММЫ-ПРОДУЦЕНТЫ ДЛЯ ИНТЕНСИВНОГО КОМПСТИРОВАНИЯ ПТИЧЬЕГО ПОМЕТА

^{1,2,3} Франк Ю.А., ^{1,2} Перченко Р.В., ² Савельева К.С., ² Трушина А.С., ¹ Анциферов Д.В.

¹Общество с ограниченной ответственностью «Дарвин», г. Томск, Российская Федерация

²Томский государственный университет, г. Томск, Российская Федерация

³Томский научно-исследовательский и проектный институт нефти и газа, г. Томск, Российская Федерация

Аннотация. Компостирование отходов птицеводства в естественных условиях – довольно продолжительный процесс. Применение биопрепаратов на основе термотолерантных и термофильных микроорганизмов позволяет интенсифицировать созревание компоста. В ходе работы выделены новые штаммы термофильных микроорганизмов-деструкторов органического вещества. Изоляты идентифицированы как представители родов *Bacillus*, *Aneurinibacillus*, *Aeribacillus* и *Ureibacillus*. Выделенные штаммы могут быть рекомендованы для включения в состав биопрепаратов для ускорения компостирования птичьего помета и других отходов животноводства.

Ключевые слова. Птичий помет, компостирование, микробные биопрепараты, термофильные микроорганизмы.

NOVEL BACTERIAL PRODUCER STRAINS FOR INTENSIVE COMPOSTING OF POULTRY LITTER

^{1,2,3} Frank Y.A., ^{1,2,3} Perchenko R.V., ² Savelieva K.S., ² Trushina A.S., ¹ Antsiferov D.V.

¹Limited Liability Company «Darwin», Tomsk, Russian Federation

²Tomsk State University, Tomsk, Russian Federation

³Tomsk Oil and Gas Research and Design Institute, Tomsk, Russian Federation

Abstract. Poultry waste composting in natural conditions is a rather slow process. Application of biological preparations based on thermo-tolerant and thermophilic microorganisms can intensify the compost maturation. Novel strains of thermophilic microorganisms — organic matter destructors — were isolated in the current work. The isolates were identified as representatives of *Bacillus*, *Aneurinibacillus*, *Aeribacillus*, and *Ureibacillus* genera. Isolated strains can be recommended for biological preparations to accelerate composting of poultry litter and other livestock farming waste.

Keywords. Poultry wastes, composting, microbial preparations, thermophilic microorganisms.

В настоящее время растет интерес к разработке стратегий и подходов для устойчивого сельскохозяйственного производства. Органические удобрения на основе отходов животноводства в связи с этим рассматриваются как более экологичная альтернатива минеральным удобрениям [1], [2]. Процесс компостирования пометов и навозов сводит к минимуму некоторые агрохимические и санитарно-биологические риски, связанные с использованием органических отходов [3].

До недавнего времени самым распространённым методом была организация площадок по естественному компостированию отходов. Существенными минусами такого вида переработки являются: (1) длительный срок «деактивации» отходов, влекущий за собой необходимость постоянного увеличения площадей; (2) значительная вероятность попадания загрязняющих веществ в атмосферу, почву и воду; (3) высокий риск сохранения условно-патогенных микроорганизмов, яиц гельминтов и цист простейших; (4) невозможность производства товарного продукта со стабильными характеристиками вследствие неконтролируемого процесса компостирования. Переработка отходов путем аэробного компостирования с внесением микробных биопрепаратов позволяет решить проблему и получить в короткие сроки (20-30 дней) органическое удобрение для восстановления баланса органического вещества и макроэлементов в почве с повышением плодородия и, как следствие, урожайности сельскохозяйственных культур. Выделение и характеристика новых высокоактивных штаммов-продуцентов для применения в составе биопрепаратов будет способствовать развитию технологий интенсивного компостирования отходов животноводства.

Цель работы состояла в поиске новых штаммов термофильных микроорганизмов – потенциальных продуцентов для интенсивного компостирования птичьего помёта и других

животноводческих отходов. В задачи исследования входило выделение чистых культур микроорганизмов и их идентификация путем анализа последовательностей гена 16S рНК.

Источником для выделения штаммов K1-2 – K1-10 послужили пробы компостируемого куриного помёта, отобранные на площадке в районе с. Лаврово (Томская область, Томский район, участок ООО «Сельскохозяйственный производственный комплекс «Межениновский»). Штаммы K2-1 – K2-2 выделены из куриного помёта Туганского отделения Птицефабрики «Томская», отобранного на площадке вблизи п. Рассвет (Томская область, Томский район, Копыловское сельское поселение). Первичные накопительные культуры были получены на богатой питательной среде с добавлением мелассы в качестве источника углерода при 55 °С. Чистые культуры выделяли методом Коха на мясопептонном агаре (МПА) и на питательном агаре с добавлением мальтэкстракта (МЕА). Изоляты культивировали в аэробных условиях при температуре 55 °С. Анализировали последовательности гена 16S рНК, близкие к полным, полученные в результате секвенирования продуктов ПЦР по Сэнгеру. Для идентификации выделенных микроорганизмов использовали базу данных GenBank NCBI и инструмент BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Длина проанализированных последовательностей составила от 1423 до 1448 пар оснований (п.о.), для каждого штамма этот параметр указан в таблицах 1 и 2.

Таблица 1 – Результаты идентификации штаммов термофильных бактерий, выделенных из компостируемых отходов Межениновской птицефабрики

Штамм / длина посл-ти	Филогенетическая группа	Ближайший родственник (источник выделения)	Номер доступа NCBI	% сходства
K1-2 1441 п.о.	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Paenibacillaceae; <i>Aneurinibacillus</i>	<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i> штамм SSA4 Горячие источники, Индонезия	MH988755	99.93
K1-3 1448 п.о.	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; <i>Bacillus</i>	Некультивируемая бактерия клон PS2576 Компостная куча, Финляндия	FN667355	98.62
K1-6 1432 п.о.	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; <i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i> sp. штамм ChS-9 Высокотемпературный компост в аэробных условиях, Япония	LC315766	100.0
K1-7 1433 п.о.	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; <i>Bacillus</i>	Некультивируемая бактерия клон PS2576 Компостная куча, Финляндия	FN667355	99.65
K1-8 1432 п.о.	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; <i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i> sp. штамм ChS-9 Высокотемпературный компост в аэробных условиях, Япония	LC315766	100.0
K1-10 1426 п.о.	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Paenibacillaceae; <i>Aneurinibacillus</i>	<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i> штамм SSA4 Горячие источники, Индонезия	MH988755	99.93

Все выделенные штаммы представлены грамположительными спорообразующими палочковидными клетками, растущими при 55 °С на богатых питательных средах. Анализ последовательностей гена 16S рНК показал их принадлежность к бактериальному порядку Bacillales внутри класса Bacilli, филум Firmicutes с гомологией последовательностей 99.32 – 100.0 % (таблицы 1 и 2). На уровне более низких таксонов между штаммами наблюдались различия. Среди термофильных бактерий, выделенных из компостируемых отходов Межениновской птицефабрики, отмечены представители родов *Bacillus* и *Aneurinibacillus* (таблица 1). Интересно, что ближайший родственник штаммов K1-2 и K1-10, *Aneurinibacillus thermoaerophilus* SSA4, выделен из воды горячего источника в Индонезии. Для представителей этого вида ранее была показана способность к продукции термостабильных липаз и щелочных целлюлаз [4], [5]. Остальные штаммы представлены бактериями рода *Bacillus*, их ближайшие родственники были детектированы или выделены из сайтов аэробного компостирования (таблица 1).

Среди бактерий, выделенных из отходов Томской птицефабрики, идентифицированы представители родов *Bacillus*, *Aeribacillus* и *Ureibacillus* (таблица 2). *Aeribacillus pallidus*, один из штаммов которого является ближайшим родственником изолята K2-1, - продуцент сериновой щелочной протеазы [6]. *Ureibacillus thermosphaericus* - ближайший родственник штамма K2-4 изначально был описан как

термофильный *Bacillus thermosphaericus*, но впоследствии реклассифицирован [7]. Представители *Ureibacillus thermosphaericus* известны как продуценты термостабильных эстераз [8]. Ближайшие родственники изолятов K2-2 и K2-3 также представлены бактериями класса Bacillales, они были выделены из компостируемых органических отходов (таблица 2). Отметим, что среди ближайших родственников изолятов, полученных из обоих сайтов, нет патогенных или условно-патогенных микроорганизмов.

Таблица 2 – Результаты идентификации штаммов термофильных бактерий, выделенных из отходов Томской птицефабрики

Штамм / длина посл-ти	Филогенетическая группа	Ближайший родственник (источник выделения)	Номер доступа NCBI	% сходства
K2-1 1434 п.о.	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; <i>Aeribacillus</i>	<i>Aeribacillus pallidus</i> strain FJAT-47862 Нет данных об источнике выделения	MF040284	99.37
K2-2 1423 п.о.	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Planococcaceae; <i>Ureibacillus</i>	<i>Ureibacillus suwonensis</i> strain 6T29 Выделен и описан из компостируемых отходов хлопка	AY850380	99.58
K2-3 1426 п.о.	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; <i>Bacillus</i>	<i>Bacillus thermoamylovorans</i> strain ASC815 Выделен из компоста, Китай	JQ796004	99.93
K2-4 1432 п.о.	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Planococcaceae; <i>Ureibacillus</i>	<i>Ureibacillus thermosphaericus</i> Нет данных об источнике выделения	MN511785	99.93

Таким образом, из отходов птицефабрик в Томской области выделены новые штаммы термофильных спорообразующих микроорганизмов. Штаммы идентифицированы как представители родов *Bacillus*, *Aneurinibacillus*, *Aeribacillus* и *Ureibacillus*. Ближайшие родственники большинства штаммов ранее были найдены в высокотемпературных сайтах, в том числе связанных с биотермическим процессом компостирования органического материала. Все выделенные штаммы активно растут на питательных средах, богатых органическим веществом, демонстрируют устойчивость к высоким температурам и могут быть рекомендованы для включения в состав биопрепаратов для ускорения компостирования птичьего помета и других отходов животноводства.

Исследование выполнено в рамках инициативной НИР.

Список использованных источников

1. Composted cattle manure increases microbial activity and soil fertility more than composted swine manure in a submerged rice paddy /S. Das [et al.]// Front. Microbiol. – 2017. – V. 8. – 1702.
2. Use of compost as an alternative to conventional inorganic fertilizers in intensive lettuce (*Lactuca sativa* L.) crops – effects on soil and plant /T. Hernández [et al.]// Soil Tillage Res. – 2016. – V. 160. – P. 14–22.
3. Soil and water environmental effects of fertilizer-, manure-, and compost based fertility practices in an organic vegetable cropping system /G. Evanylo [et al.]// Agric. Ecosyst. Environ. – 2008. – V. 127. – P. 50–58.
4. A new thermostable lipase by *Aneurinibacillus thermoaerophilus* strain HZ: Nutritional studies /R. Rahman [et al.]// Annals of Microbiology. – 2009. – V. 59. – P. 133–139.
5. Alkaline cellulase produced by a newly isolated thermophilic *Aneurinibacillus thermoaerophilus* WBS2 from hot spring, India /S. Acharya, A. Chaudhary// African Journal of Microbiology Research. – 2012. – V. 6., № 26. – P. 5453–5458.
6. Purification and biochemical characterization of a novel thermostable serine alkaline protease from *Aeribacillus pallidus* C10: a potential additive for detergents /V. Yildirim [et al.]// J. Enzyme Inhib. Med. Chem. – 2017. – V. 32, № 1. – P. 468–477.
7. *Ureibacillus* gen. nov., a new genus to accommodate *Bacillus thermosphaericus* (Andersson et al. 1995), emendation of *Ureibacillus thermosphaericus* and description of *Ureibacillus terrenus* sp. nov. /M.G. Fortina [et al.]// Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2001. – V. 51, № 2. – P. 447–455.

9. Термостабильная эстераза estUT1 бактерии *Ureibacillus thermosphaericus*: влияние дополнительного процессируемого домена TrxA на свойства фермента /К.Н. Сорокина [и др.]// Катализ в промышленности. – Т. 19, № 5. – Р. 399–407.