

М.С. Дуамбеков¹, Н.Б. Молдагулова², А.Ж. Аюпова³, Э.Ж. Хасенова⁴,
Д.Ж. Сембаева⁵

Учреждение «Международная академия экологии», Астана, Казахстан
(E-mail: ¹mae_astana@mail.ru, ²m_nazira1967@mail.ru, ³a.ibraeva@mail.ru,
⁴elmira_alta@mail.ru, ⁵sembaeva_1981@mail.ru)

Изучение фенотипических свойств активных штаммов микроорганизмов способных ферментировать органические отходы

Аннотация: В данной работе представлены результаты выделения и скрининга микроорганизмов, перспективных для переработки органических отходов на сельскохозяйственных предприятиях. Из органических отходов методом накопительной культуры выделено 32 изолята и проведен скрининг выделенных микроорганизмов по способности к росту на животноводческих и птицеводческих отходах, способности нейтрализовать неприятные запахи помета и навоза, а также по способности в процессе роста повышать температуру органических веществ. По результатам скрининга отобрано 15 культур микроорганизмов, способных к репродукции на органических отходах. Дальнейший отбор культур проводили по ферментативной активности. Изучали амилолитическую, протеолитическую, целлюлолитическую и липазную активность отобранных изолятов. Путем постановок ряда тестов были изучены фенотипические свойства (физиолого-биохимические и культурально-морфологические) активных штаммов микроорганизмов, способных ферментировать органические отходы.

Ключевые слова: микроорганизмы, органические отходы, животноводческие отходы, птичий помет, ферментация.

DOI: <https://doi.org/10.32523/2616-7034-2018-125-4-41-48>

Введение. В Казахстане, как и во многих странах мира, активно развивается животноводческая отрасль. В свою очередь становление животноводства в стране привело к скоплению большого количества отходов рядом с птицефабриками и на территории животноводческих ферм, влияющих на экологическое состояние страны. Все это представляет постоянную угрозу экологическому благополучию населения страны. Кроме того, отходы жизнедеятельности сельскохозяйственного производства могут привести к опасному загрязнению водно-воздушного бассейна, почв, и привести к росту заболеваемости животных и населения.

Беря во внимание, что отходы жизнедеятельности животных и птиц в своем составе содержат большое количество токсичных веществ и то, что они загрязняют окружающую среду, возникает надобность утилизировать их экологически безопасным путем. Для утилизации животноводческих отходов в разных странах применяются всевозможные методы: компостирование, вирмикомпостирование, ферментация [1, 2].

Наиболее выгодным решением этой проблемы является внедрение ускоренной биологической ферментации органических отходов птицефабрик и животноводческих ферм. Для этой цели в мировой практике применяют различные биологические препараты, изготовленные из отобранных культур эффективных микроорганизмов, способствующих ускоренному ферментированию отходов животноводческих комплексов [3,4,5,6]. Использование таких препаратов ускоряет процесс переработки отходов и позволяет сократить время переработки в несколько раз. Это значительно снижает объем занимаемых площадей, необходимых для временного хранения навозных стоков. Отсутствие собственных отечественных разработок в данном направлении и накопившиеся многочисленные экологические проблемы диктуют необходимость выделения микроорганизмов, перспективных для переработки органических отходов и разработки на их основе отечественного биологического препарата.

Материалы и методы исследования. С целью выделения микроорганизмов, перспективных для ферментации органических отходов на предприятиях агропромышленного

комплекса отобраны пробы отходов сельскохозяйственных животных. Источниками выделения мезофильных и термофильных бактерий являлись птичий помет и навоз крупного рогатого скота. Выделение микроорганизмов проводили методом накопительных культур на таких универсальных питательных средах, как сухой питательный бульон, мясопептонный бульон, бульон МРС (Ман, Рогоза, Шарп) и жидкая среда Сабуро. Посевы для выделения мезофильных бактерий культивировали в термостате при 30-37 °С в течение 72 ч. Процесс выделения культур термофильных бактерий аналогичен процессу выделения мезофильных, при этом термофильные бактерии культивировали в термостате при 55 °С в течение 72 ч. Чистые культуры микроорганизмов пересевали на плотные питательные среды СПА, МПА, МРС, Сабуро методом истощающего штриха по Гоулду. Инкубацию культур производили при 37 °С и 55 °С в течение 48-72 часов. Чистоту выделенных культур микроорганизмов оценивали общепринятыми методами – микроскопическим контролем по Грамму и высевом на среду МПА.

Результаты исследований. По результатам выделения культур микроорганизмов из проб птичьего помета и навоза крупного рогатого скота выделено 32 изолята из которых мезофильных – 22 культуры, термофильных - 10 культур микроорганизмов. Первичный скрининг выделенных микроорганизмов проводили по способности к росту на животноводческих и птицеводческих отходах, способности нейтрализовать неприятные запахи помета и навоза, а также по способности в процессе роста повышать температуру органических веществ.

На рисунке 1 представлено первичное выделение микроорганизмов.

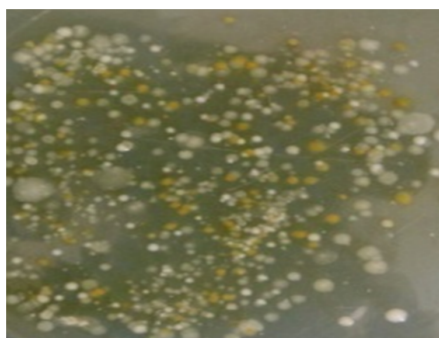


Рисунок 1 – Первичное выделение микроорганизмов

Серию опытов с куриным пометом и коровьим навозом проводили в небольших ямах. Органические отходы предварительно нагревали до 30 °С и увлажняли для быстрого старта вносимых бактерий. Далее вносили бактерии и тщательно перемешивали. Перемешанный помет и навоз влажностью 45-50% вносили в яму и ежедневно наблюдали за температурой, изменением цвета и запаха (рисунок 2).



Рисунок 2 – Ферментация органических отходов

В результате скрининга отобрано 15 культур микроорганизмов, способных к репродукции в органических отходах. Отобранные культуры при температуре внесения 30 °С в навоз и

птичий помет (далее органика) в дозе 6,0 lg КОЕ/ см³, стартуют быстрее, чем при внесении указанной дозы в органику ниже 25 °С.

Органолептические показатели органических отходов приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Визуальный и органолептический анализ куриного помета и коровьего навоза, обработанный изолятами микроорганизмов

Изолят	начальная			через 5 суток			через 10 суток		
	запах	температура	цвет	запах	температура	цвет	запах	температура	цвет
контроль	Р.с.а.з	30°С	-	Р.с.а.з		-	Р.с.а.з	25°С	-
П1-1,КН2-8,СН3-28,СН3-4,СН3-16	Р.с.а.з	30°С	-	И.з	38°С	+	И.з	60°С	+
П1-2,КП-6,СН3-6	Р.с.а.з	30°С	-	О.р.а.з		-	О.р.а.з	29°С	+
КН2-17,КН2-16	Р.с.а.з	30°С	-	О.р.а.з		-	О.р.а.з	24°С	+
П1-15,П1-7,СН3-2	Р.с.а.з	30°С	-	О.р.а.з	35°С	+	И.з	50°С	+
СН3-26,П1-9, П1-10	Р.с.а.з	30°С	-	О.р.а.з		-	О.р.а.з	25°С	+
П1-11,КН2-6,КП-4	Р.с.а.з	30°С	-	Р.с.а.з		-	О.р.а.з	25°С	-
П1-12,СН3-1,КН2-11,П1-4	Р.с.а.з	30°С	-	Р.с.а.з		-	Р.с.а.з	25°С	-
П1-8,П1-13,КН2-9, КП-1	Р.с.а.з	30°С	-	О.р.а.з	38°С	+	И.з	55°С	+
П1-14,СН3-3	Р.с.а.з	30°С	-	О.р.а.з		-	О.р.а.з	35°С	+
КН2-1,КН2-7,СН3-27	Р.с.а.з	30°С	-	О.р.а.з		+	И.з	52°С	+
Примечания Р.с.а.з - Резкий, специфический аммиачный запах О.р.а.з.- Ослабление резкого специфического запаха И.з – исчезновение запаха «+» - наблюдается изменение цвета «-» - нет изменения цвета									

При культивировании культур при 30 °С на 3-4 сутки общий титр клеток на среде МРС достигает до 8,0 lg КОЕ/ см³. Также при этом наблюдается повышение температуры до 60 °С на 8-10 сутки.

Кроме того, отбор культур проводили по ферментативной активности. Изучение ферментативной активности выделенных изолятов проводили путем определения амилолитической, протеолитической, целлюлолитической и липазной активностей.

На рисунке 3 представлены протеолитическая, амилолитическая и липазная активность изолята.

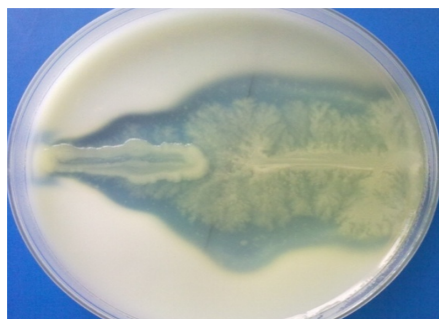


Рисунок 3 – Липолитическая активность изолята

Изучение липолитической активности изолятов показало наличие 5 культур, способных к деструкции жиров. Амилолитической активностью обладали 10 культур. Размеры зоны гидролиза колебались в пределах 0,7-1,9 мм. Восемь культур расщепляли казеин на молочном агаре. При культивировании микроорганизмов на жидкой среде Гетчинсона с добавлением

фильтровальной бумаги только 7 изолятов проявили способность разрушать целостность фильтровальной бумаги и образовывать хлопьевидное помутнение среды. Изучение ферментативной активности отобранных изолятов приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Ферментативная активность отобранных изолятов

Изоляты	Протеолити-ческая активность	Амилолити-ческая активность	Липолити-ческая активность	Целлюлолити-ческая активность
П1-1,	+	+	+	-
КН2-8	+	+	+	+
СН3-28	-	+	-	+
СН3-4	+	-	+	-
СН3-16	-	+	+	-
П1-15,	-	+	-	+
П1-7,	-	-	-	-
СН3-2	+	+	-	+
П1-8	-	-	-	-
П1-13	+	+	-	+
КН2-9	-	-	-	+
КП-1	+	+	+	-
КН2-1	+	+	-	+
КН2-7	+	-	-	-
СН3-27	-	+	-	-
Примечания «+» - положительная реакция, «-» - отрицательная реакция				

В результате изучения ферментативной активности 8 культур проявили протеолитическую активность, 10 культур обладали амилазной активностью, 5 культур - липазной и 7 культур - целлюлолитической активностью.

Путем постановок ряда тестов были изучены физиолого-биохимические и культурально-морфологические свойства культур микроорганизмов, проявивших наибольшую активность.

Дальнейшее изучение физиолого-биохимических свойств отобранных микроорганизмов показало, что 12 культур – уреазоположительные, 3 – оксидазоположительные, 7 культур гидролизуют крахмал, все 15 культур, кроме 3 - каталазоположительные, 8 – не разжижают желатин, 10 культур - не дезаминируют фенилаланин, 10 культур - гидролизуют казеин (таблица 3).

На рисунке 4 представлено отношение отобранных микроорганизмов к кислороду. По отношению к кислороду 6 культур относятся к факультативным анаэробам, 9 культур - к микроаэрофилам.

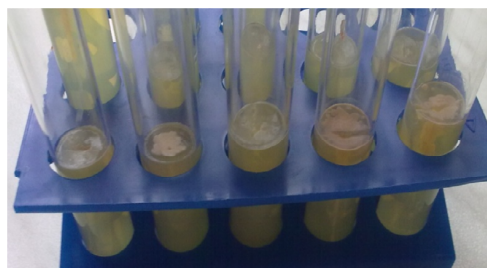


Рисунок 4 – Отношение к кислороду отобранных культур микроорганизмов

Далее определяли усвоение углеводов отобранными микроорганизмами. По отношению к углеводам 2 культуры из 15 культур микроорганизмов не усваивают сахарозу, лактозу, инозит, арабинозу, целлобинозу, салицин. Результаты усвоения углеводов отобранными изолятами отражены в таблице 4.

Таблица 3 – Физиолого-биохимические свойства отобранных изолятов

Изоляты	Наличие уреазы	Наличие оксидазы	Наличие каталазы	Гидролиз казеина	Гидролиз крахмала	Разжижение желатины	Дезаминир. фенилаланина	Отношение к O ₂
П1-5	+	-	+	+	+	-	+	ф.а
КН2-8	+	+	+	+	-	+	-	м
СН3-28	+	-	-	+	+	+	+	м
СН3-4	+	-	+	-	+	-	-	м
СН3-16	-	+	+	-	+	-	-	м
П1-15	+	-	-	+	-	-	-	м
П1-7	+	-	+	+	-	+	-	ф.а
СН3-2	+	-	-	+	+	-	-	м
П1-8	+	-	+	-	-	+	+	м
П1-13	+	-	+	+	+	+	-	м
КН2-9	-	-	+	+	-	-	+	ф.а
КП-1	+	-	+	-	+	+	-	ф.а
КН2-1	+	-	+	+	-	-	-	ф.а
КН2-7	+	-	+	+	-	+	+	ф.а
СН3-27	-	+	+	-	-	-	-	м

Примечания
 «+» - положительная реакция,
 «-» - отрицательная реакция
 «ф.а» - факультативный аэроб
 «м» - микроаэрофил

Таблица 4 – Усвоение углеводов отобранными изолятами

Изоляты	сахара-роза	лактоза	арабиноза	глюкоза	ксилоза	мальтоза	фруктоза	трегалоза	инозит	галактоза	целлобиноза	манноза	сорбитол	салицин
П1-1	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
КН2-8	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
СН3-28	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
СН3-4	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
СН3-16	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
П1-15	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+
П1-7	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
СН3-2	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+
П1-8	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+
П1-13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
КН2-9	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
КП-1	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
КН2-1	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-
КН2-7	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
СН3-27	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+

Примечания
 «+» - положительная реакция,
 «-» - отрицательная реакция

3 культуры не усваивают сорбитол, ксилозу, фруктозу; 4 культуры не усваивают трегалозу, галактозу, маннозу; 5 культур не усваивают мальтозу; 9 культур не усваивают глюкозу. На рисунке 5 представлено использование углеводов отобранными изолятами.

Культурально-морфологические свойства отобранных микроорганизмов изучали с использованием жидких и твердых питательных сред. На плотной среде культуры образовывали колонии бежевого, розового и белого цветов различных размеров слизистой и пастообразной консистенции. Большинство бактерий образует круглые колонии однородной структуры, 4 культуры имеют амебовидную форму колоний. На рисунке 6 представлены культуральные свойства отобранных микроорганизмов.

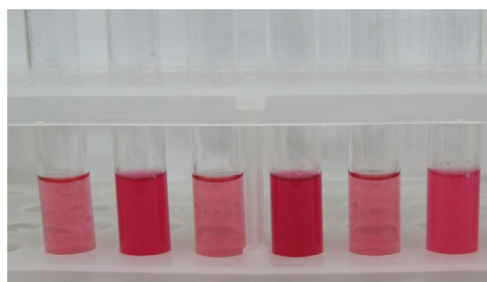


Рисунок 5 – Использование углеводов отобранными изолятами

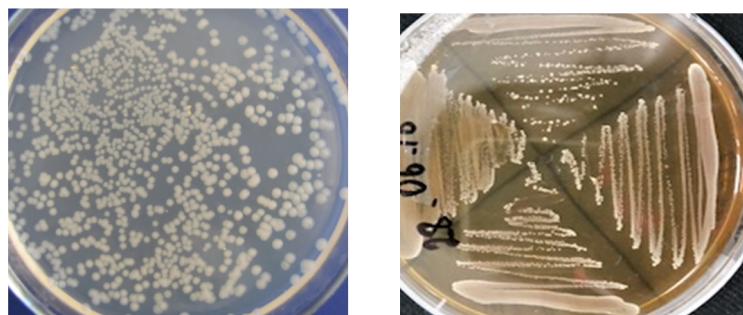


Рисунок 6 – Культуральные свойства отобранных микроорганизмов

По морфологическим свойствам в мазках при микроскопии бактериальных клеток показано, что 12 культур бактерий имеют палочковидную форму, остальные 4 – коккоподобные палочки. Исследуемые культуры, кроме 3 – грамположительные. На рисунке 7 представлена морфология клеток исследуемых микроорганизмов.

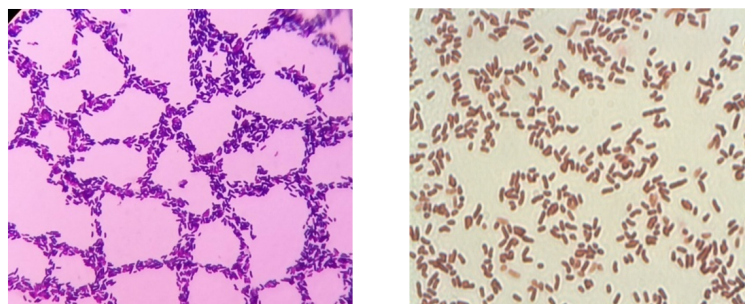


Рисунок 7 – Морфология клеток исследуемых микроорганизмов

Выводы. Таким образом, в результате выделения и скрининга микроорганизмов, перспективных для переработки органических отходов на предприятиях АПК, из сельскохозяйственных отходов методом накопительной культуры выделено 32 изолята. Скрининг выделенных микроорганизмов по способности к росту на животноводческих и птицеводческих отходах, способности нейтрализовать неприятные запахи помета и навоза, а также по способности в процессе роста повышать температуру органических веществ позволил отобрать 15 культур микроорганизмов, способных к репродукции на органических отходах. В дальнейшем изучали амилолитическую, протеолитическую, целлюлолитическую и липазную активность отобранных изолятов. Путем постановок ряда тестов были изучены фенотипические свойства отобранных культур.

Список литературы

- 1 Капустин, В.П. Обоснование способов и средств переработки бесподстилочного навоза / В.П. Капустин. – Тамбов : Изд-во Тамб. гос. техн. ун-та, 2002. – 80 с.
- 2 Ковалев Н.Г. Новые технологии высококачественных удобрений и кормовых добавок. Тверь, 2000. – С. 1–25.

- 3 Шаблин, П.А. Применение ЭМ-технологии в сельском хозяйстве / П.А. Шаблин // Микробиологические препараты «Байкал ЭМ1», «Тамир», «ЭМ-Курунга» // Практическая биотехнология в сельском хозяйстве, экологии, здравоохранении : сб. тр. – М., 2006. – С. 23–36.
- 4 Биопрепарат для переработки навоза [Электрон.ресурс] – 1016. – BIOFORCE Farming. -URL: <http://elektroximnab.ru/biopreparaty-bioforce/bakterii-dlja-zhivotnovodstva-i-pticevodstva>
- 5 Гныдюк В.С., Мельник И.А. Технологические аспекты переработки органических отходов животноводческих комплексов и птицефабрик методом биологической ферментации в органические удобрения нового поколения "Биоферм" // Сб. науч. трудов Подольского гос. Аграрно-техн. ун. Каменец-Подольский, 2009. № 17. – С. 97–101.
- 6 ProBios-Пробиотик [Электрон.ресурс] – 1017. -URL: <http://odliva.lt/ru/doktor.html>

М.С. Дуамбеков, Н.Б. Молдагулова, А.Ж. Аюпова, Э.Ж. Хасенова, Д.Ж. Сембаева

"Халықаралық экология академия" мекемесі, Астана, Қазақстан

Органикалық қалдықтарды ферменттеуге қабілеті бар белсенді микроорганизмдер штамдарының фенотиптік қасиеттерін зерттеу

Аннотация: Бұл мақалада ауыл шаруашылық кәсіпорындарында органикалық қалдықтарды өңдеу үшін белсенді микроорганизмдердің оқшаулану және скринингінің нәтижелері келтірілген. Органикалық қалдықтарынан 32 изолят бөлініп алынды және де бөлініп алынған микроорганизмдерге скрининг жұмыстары жүргізіліп олардың мал мен құс қалдықтарында өсу қабілетін, көң және көңді жағымсыз иістерін бейтараптандыру, сондай-ақ өсу кезінде органикалық заттардың температурасын көтеру мүмкіндігі анықталды. Скрининг нәтижелері бойынша органикалық қалдықтарда репродукциялауға қабілетті 15 микроорганизм өсіндісі таңдалды. Өсіндіні әрі қарай іріктеу ферментативті белсенділікпен жүзеге асырылды. Таңдалған изоляттардың амилолитикалық, протеолитикалық, целлюлитикалық және липаза белсенділігі зерттелді. Органикалық қалдықтарды ферменттеуге қабілетті микроорганизмдердің белсенді штамдарының фенотиптік қасиеттері (физиологиялық, биохимиялық, культуральдік және морфологиялық) бірқатар сынақтар жасау арқылы зерттелді.

Түйін сөздер: микроорганизмдер, органикалық қалдықтар, жануарлардың қалдықтары, құс саңылықтары, ферменттеу.

М.С. Duambekov¹, N.B. Moldagulova², A.Zh. Ayupova³, E.Zh. Khassenova⁴, D.Zh. Sembaeva⁵

«International Ecology Academy», Astana, Kazakhstan

The study of the phenotypic properties of active strains of microorganisms capable of fermenting organic waste

Abstract: This paper presents the results of the isolation and screening of microorganisms that are promising for the processing of organic waste in agricultural enterprises. Of the organic waste, 32 isolates were isolated by the method of cumulative culture and screening of the isolated microorganisms for their ability to grow on livestock and poultry farms, the ability to neutralize the unpleasant odors of manure, and also the ability to increase the temperature of organic substances during growth. Based on the results of the screening, 15 cultures of microorganisms capable of reproduction in organic wastes were selected. Further selection of cultures was carried out by enzymatic activity. Amylolytic, proteolytic, cellulolytic and lipase activity of selected isolates was studied. Phenotypic properties (physiological, biochemical, cultural and morphological) of active strains of microorganisms capable of fermenting organic waste were studied by means of testing.

Keywords: microorganisms, organic waste, animal waste, bird droppings, fermentation.

References

- 1 Kapustin V.P. Obosnovanie sposobov i sredstv pererabotki bespodstilochnogo navoza [Justification of the methods and means of processing of manure] (Tambov, 2002, 80 p.) [in Russian]
- 2 Kovalev N.G. Novye tehnologii vysokokachestvennyh udobrenij i kormovyh dobavok [New technologies of high-quality fertilizers and feed additives] (Tver' - 2000. - S. 1-25). [in Russian]
- 3 Shablin, P.A. Primenenie JeM-tehnologii v sel'skom hoz'jajstve [Application of EM technology in agriculture] Mikrobiologicheskie preparaty "Bajkal JeM1", "Tamir", "JeM-Kurunga" [Microbiological preparations "Baikal EM1", "Tamir", "EM-Kurung"], Prakticheskaja biotehnologija v sel'skom hoz'jajstve, jekologii, zdravoohranenii [Practical biotechnology in agriculture, ecology, healthcare] Moscow (2006) 23-36 [in Russian]
- 4 Biopreparat dlja pererabotki navoza [Biological product for manure processing] - 1016.-BIOFOR(Farming. Available at: <http://elektroximnab.ru/biopreparaty-bioforce/bakterii-dlja-zhivotnovodstva-i-pticevodstva>).
- 5 Gnydjuk V.S., Mel'nik I.A. Tehnologicheskie aspekty pererabotki organicheskikh othodov zhivotnovodcheskih kompleksov i pticefabrik metodom biologicheskoy fermentacii v organicheskie udobrenija novogo pokolenija "Bioferm" [Technological aspects of processing organic waste from livestock farms and poultry farms using biological fermentation into organic fertilizers of the new generation "Bioferm"] Kamenec-Podol'skij, (17) 97-101 (2009) [in Russian]
- 6 ProBios-Probiotik [Electronic resource] - 1017. Available at: <http://odliva.lt/ru/doktor.html>

Сведения об авторах:

Дуамбеков М.С. - доктор технических наук, профессор, Президент Учреждения "Международная академия экологии", Рыскулбекова 16/1, ВП-12, Астана, Казахстан.

Молдагулова Н.Б. - кандидат ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник Учреждения "Международная академия экологии", Рыскулбекова 16/1, ВП-12, Астана, Казахстан.

Аюпова А.Ж. - магистр, старший научный сотрудник Учреждения "Международная академия экологии", Рыскулбекова 16/1, ВП-12, Астана, Казахстан.

Хасенова Э.Ж. - магистр, старший научный сотрудник Учреждения "Международная академия экологии", Рыскулбекова 16/1, ВП-12, Астана, Казахстан.

Сембаева Д.Ж. - научный сотрудник Учреждения "Международная академия экологии", Рыскулбекова 16/1, ВП-12, Астана, Казахстан.

Duambekov M.S. - Doctor of Technical Sciences, Professor, President of the "International Academy of Ecology", Ryskulbekov 16/1, VP-12, Astana, Kazakhstan.

Moldagulova N.B. - Candidate of Veterinary Sciences, Leading Researcher of the "International Academy of Ecology", Ryskulbekova 16/1, VP-12, Astana, Kazakhstan.

Ayupova A.Zh. - Master, Senior Researcher of the "International Academy of Ecology", Ryskulbekov 16/1, VP-12, Astana, Kazakhstan.

Khassenova E.Zh. - Master, Senior Researcher of the "International Academy of Ecology", Ryskulbekov 16/1, VP-12, Astana, Kazakhstan.

Sembayeva D.Zh. - Research Fellow of the "International Academy of Ecology", Ryskulbekov 16/1, VP-12, Astana, Kazakhstan.

Поступила в редакцию 17.12.2018