

Галина Васильевна Петрова

Оренбургский государственный аграрный университет, профессор кафедры земледелия, почвоведения и агрохимии, доктор сельскохозяйственных наук, Россия, Оренбург

E-mail: petrova_ogau@mail.ru

Айгуль Дикатовна Буракаева

Оренбургский государственный университет, старший научный сотрудник управления научных исследований и подготовки кадров, кандидат биологических наук, Россия, Оренбург

E-mail: aigulburakaeva@mail.ru

Сергей Васильевич Сорокун

Оренбургский государственный аграрный университет, старший научный сотрудник управления научных исследований и подготовки кадров, Россия, Оренбург

E-mail: sv_sorokun@mail.ru

Александр Павлович Шишкин

Оренбургский государственный аграрный университет, доцент кафедры микробиологии и заразных болезней, кандидат ветеринарных наук, Россия, Оренбург

E-mail: 922304@mail.ru

ПОЛУЧЕНИЕ ОРГАНИЧЕСКОГО ПРОДУКТА, ОБЛАДАЮЩЕГО СВОЙСТВОМ БИОУДОБРЕНИЯ, ПУТЕМ БИОКОНВЕРСИИ ПТИЧЬЕГО ПОМЕТА

В работе исследовалась возможность использования штамма бактерии *Bacillus subtilis* 534 – продуцента препарата споробактерина для обеззараживания и переработки свежего птичьего помета в биоудобрения. Штамм бактерии *Bacillus subtilis* 534 на жидкой фракции помета и дренажных водах птицеводческого предприятия проявлял способность к биосинтезу комплекса гидролитических ферментов. Амилолитическая, протеолитическая, целлюлолитическая и липолитическая активность обнаруживалась уже через 24 часа роста культуры. Штамм проявлял антагонистические свойства в отношении: *Escherichia coli* K12 (ATCC 25922), *Escherichia coli* 354, *Staphylococcus aureus* P 209 (ATCC 6538-452), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Pseudomonas fluorescens* ВКПМ В-350, *Pseudomonas putida* КМ МГУ 95, *Candida albicans* 54. Культивирование штамма *Bacillus subtilis* 534 на жидкой фракции в биореакторах аэробного типа позволяло улучшить показатели жидких отходов птицефабрики. Полужидкие и твердые фракции птичьего помета с общим микробным числом (ОМЧ) $9 \cdot 10^6$ КОЕ/мл и коли-титром $\geq 0,001$ мл обрабатывали суспензией культуры *Bacillus subtilis* 534 из расчета 1 млрд клеток на 1 т птичьего помета на площадке, оборудованной снизу каналами для подачи воздуха, и после дальнейшей переработки помета в биоудобрение в течение 15 дней полученный органический продукт представлял собой однородную гомогенную сыпучую массу светло-коричневого цвета, без резкого запаха аммиака. Органический продукт соответствовал требованиям ГОСТ 12038-84. Эффективность полученного органического продукта испытывалась при возделывании районированного сорта нута Краснокутский-36 в лабораторных и полевых условиях. Органический продукт оказывал стимулирующее воздействие на рост и развитие растений нута и способствовал повышению урожайности. Штамм *Bacillus subtilis* 534 ранее был известен как продуцент пробиотика споробактерина, в целях для обеззараживания и утилизации отходов птицеводства и получения на его основе органического продукта, обладающего свойствами биоудобрения, не применялся.

Ключевые слова: *Bacillus subtilis*, продуцент споробактерина, переработка птичьего помета, обеззараживание птичьего помета, органический продукт, биоудобрение.

Galina V. Petrova

Orenburg State Agrarian University, professor of the chair of agriculture, soil science and agrochemistry, doctor of agricultural sciences, Russia, Orenburg

E-mail: petrova_ogau@mail.ru

Aygul D. Burakaeva

Orenburg State Agrarian University, senior staff scientist of the management of scientific researches and training, candidate of biological sciences, Russia, Orenburg

E-mail: aigulburakaeva@mail.ru

Sergey V. Sorokun

Orenburg State Agrarian University, senior staff scientist of the management of scientific researches and training, Russia, Orenburg

E-mail: sv_sorokun@mail.ru

Alexander P. Shishkin

Orenburg State Agrarian University, associate professor of microbiology and infectious diseases, candidate of veterinary sciences, Russia, Orenburg

E-mail: 922304@mail.ru

OBTAINING AN ORGANIC PRODUCT THE PROPERTY OF BIOFERTILIZATION BY BIOCONVERSION OF BIRD LITTER

The work investigated the possibility of using a bacterial strain Bacillus subtilis 534, a producer of a sporobacterin preparation for disinfection and processing of fresh poultry manure into biofertilizers. The bacterial strain Bacillus subtilis 534 on the liquid fraction of the manure and drainage waters of a poultry enterprise showed the ability to biosynthesize a complex of hydrolytic enzymes. Amylolytic, proteolytic, cellulolytic and lipolytic activity was detected after 24 hours of culture growth. The strain showed antagonistic properties against: Escherichia coli K12 (ATCC® 25922™), Escherichia coli Type 354, Staphylococcus aureus 209P (ATCC® 6538™), Pseudomonas aeruginosa (Schroeter) Migula (ATCC® 27853™), Pseudomonas fluorescens ARCIMB-350, Pseudomonas putida CM MSU 95, Candida Albicans 5ch Gr. Cultivation of the Bacillus subtilis 534 strain on the liquid fraction in aerobic bioreactors made it possible to improve the indicators of liquid waste from the poultry farm. Semi-liquid and solid fractions of poultry manure with a total microbial number (TMC) of 9×10^6 CFU / ml and a col-titer of ≥ 0.001 ml were treated with a suspension of the culture of Bacillus subtilis 534 at the rate of 1 billion cells per 1 ton of poultry manure on a platform equipped with feed channels at the bottom air and after further processing of the manure into biofertilizer for 15 days, the resulting organic product was a homogeneous homogeneous loose mass of light brown color without a pungent ammonia odor. The organic product met the requirements of GOST 12038-84. The effectiveness of the obtained organic product was tested during the cultivation of the regionalized variety of chickpea "Krasnokutsky-36" in laboratory and field conditions. The organic product had a stimulating effect on the growth and development of chickpea plants and helped to increase yields. The Bacillus subtilis 534 strain was previously known only as a producer of the probiotic sporobacterin, in order to disinfect and dispose of poultry manure and to obtain an organic product on its basis with biofertilizer properties, has not been previously used.

Key words: *Bacillus subtilis, sporobacterin producer, processing of poultry manure, disinfection of poultry manure, organic product, biofertilizer.*

Введение. Деятельность крупных птицеводческих предприятий России приводит к накоплению больших запасов помета. Птичий помет содержит достаточное количество биогенных макро- и микроэлементов и может использоваться как эффективное удобрение. Внесение

свежего помета в почву приводит к накоплению нитратов, тяжелых металлов в почве и сельскохозяйственной продукции. Кроме того, жидкие и твердые отходы птицеводства имеют высокую степень контаминирования микроорганизмами. При длительном хранении свежий помет явля-

ется источником неприятных запахов, выделений ядовитых газов, реальной угрозой возникновения эпизоотий и эпидемий. Без предварительной переработки такой помет становится источником загрязнения окружающей среды, особенно в случае применения его в качестве удобрения без предварительной обработки [1]. Для обеззараживания и переработки свежего птичьего помета в биоудобрения используются механические, физические, физико-химические, химические и биологические методы. На большинстве птицеводческих предприятий предусмотрены меры предварительного обеззараживания помета путем их карантинного выдерживания в анаэробных или аэрируемых лагунах. В зависимости от обсемененности теми или иными возбудителями инфекций такой период карантина может занимать до одного года и, по мнению ряда исследователей, абсолютно надежного обеззараживания не обеспечивает [2].

Использование биотехнологических способов переработки птичьего помета подразумевает внесение культур микроорганизмов – деструкторов – в условиях контролируемой температуры, влажности и аэрации, последующее дозревание полученной компостной массы с участием аборигенной микрофлоры на площадках или в биореакторах и позволяет получать более эффективные органические удобрения и кормовые добавки, значительно сократить сроки компостирования [3, 4]. В состав большого числа консорциумов микроорганизмов, ответственных за переработку помета, как правило, почти всегда входят штаммы сапрофитных видов бактерий рода *Bacillus*. Штаммы бактерии *Bacillus subtilis* характеризуются высокой приспособляемостью к условиям окружающей среды и способностью утилизировать разнообразные органические соединения, а также антагонистическими свойствами в отношении многих патогенных микроорганизмов. Штамм бактерии *Bacillus subtilis* 534 известен для получения пробиотика споробактерина [5]. Однако в научно-исследовательской литературе отсутствуют сведения по использованию штамма *Bacillus subtilis* 534 в обеззараживании и переработке отходов птицеводства и животноводства.

Цель исследований. Выявление способности штамма *Bacillus subtilis* 534 к обеззараживанию и переработке птичьего помета с получением

органического продукта, обладающего свойствами удобрения.

Условия, объекты и методы исследований. Объектом исследований являлся штамм бактерии *Bacillus subtilis* 534 (депонирован в ВКМ Института биохимии и физиологии микроорганизмов РАН под номером В1666 D). Выращивание посевного материала проводили в лабораторных условиях на известной питательной среде, разработанной для данного штамма [5]. Культивирование штамма *Bacillus subtilis* 534 вели в колбах Эрленмейера на 100 мл среды на круговой качалке (200–220 об/мин) при 37 °С в течение 48–72 часов до завершения фазы спорообразования. Амилолитическую, протеолитическую, целлюлолитическую и липолитическую активность определяли согласно [6, 7]. Определение степени антагонистической активности проводили методом диффузии в агар-агар в отношении тест-организмов [8, 9]. Обезвреживание и переработку жидкой, полужидкой и твердой фаз помета проводили на помехранилище птицефабрики. Для этого твердую фракцию птичьего помета предварительно отделяли от жидкой путем центрифугирования и каждую фракцию обрабатывали путем распыления суспензии биомассы штамма *Bacillus subtilis* 534 концентрацией $2 \cdot 10^5$ – $2 \cdot 10^6$ микробных тел/мл на 1 тонну навоза. Полужидкую (влажность 90–93 %) и твердую (влажность 75–80 %) фракции птичьего помета с общим микробным числом (ОМЧ) $9 \cdot 10^6$ КОЕ/мл и колититром равном $\geq 0,001$ мл обрабатывали суспензией культуры *Bacillus subtilis* 534 из расчета 1 млрд клеток на 1 т птичьего помета на площадке, оборудованной снизу каналами для подачи воздуха. Под воздействием воздуха, поступающего снизу в твердую фракцию помета, происходил рост штамма *Bac. subtilis* 534, синтез гидролитических ферментов и антимикробных веществ, подавляющих болезнетворные микроорганизмы птичьего помета. В таком виде твердую фракцию помета, периодически переворачивая, подвергали компостированию при участии аборигенной микрофлоры.

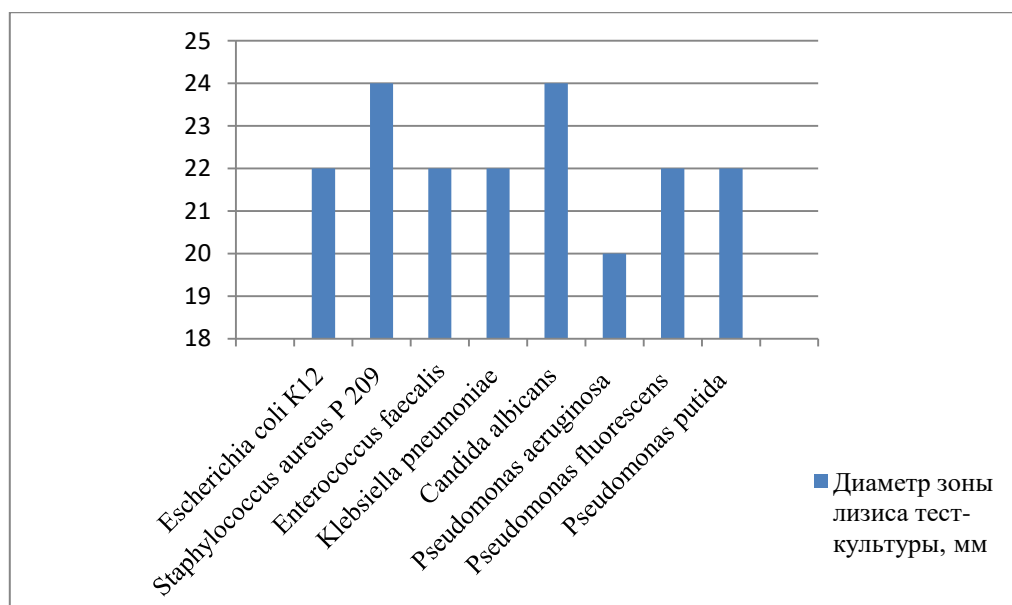
Полевые опыты заложены на учебно-опытном участке Оренбургского государственного аграрного университета. По климатическим условиям, характеру почвообразующих пород и почвенному покрову территория учебно-опытного хозяйства является типичной для зоны юж-

ных степей Оренбургского Предуралья. Почва опытного участка – чернозем южный средне-мощный карбонатный тяжелосуглинистый. Внесение органического продукта с различными нормами проводилось осенью. Глубина посева семян – 4–6 см. Всхожесть семян нута и масса 1000 зерен определяли согласно ГОСТ 12038-84 (Семена сельскохозяйственных культур. Методы анализа: сб. ГОСТов. М.: Изд-во стандартов, 2004). Урожайность семян нута учитывали путем взвешивания с каждой делянки с дальнейшим пересчетом на гектар при стандартной влажности.

Результаты исследований и их обсуждение. Штамм *Bacillus subtilis* 534 при росте на питательной среде с добавлением птичьего помета характеризовался следующими морфологическими, культуральными и биохимическими признаками: для молодой культуры характерна форма прямых палочек длиной 1,5–1,7 и шириной 0,7–0,9 мкм, слабоподвижных, с перитрихальным жгутикованием. На окрашенных фиксированных препаратах клетки бактерии располагались в виде цепочек или нитей, грамположительные, капсул не образуют. Штамм хорошо рос на плотных питательных средах и образовывал сухие плоские морщинистые колонии ограниченной формы, серо-белого цвета. По мере спорообразования колонии приобретали розоватый оттенок. На агаризованной среде на основе жидкой фракции птичьего помета штамм

образовывал морщинистые колонии грязно-серого цвета. Для роста штамма был характерен широкий диапазон температурного режима от 15 до 45 °С, при оптимальной температуре роста 36,5–37,5 °С и узкий интервал кислотности среды pH=6,5–7,5. Спорообразование происходило при росте на плотных питательных средах в аэробных условиях и температуре 36,5–37,5 °С через 48 часов роста. Споры представляли собой толстые палочки длиной 5,0–6,0 мкм, шириной 0,7–0,9 мкм. При росте на жидких питательных средах, в том числе содержащих жидкую фазу птичьего помета, штамм образовывал толстую пленку грязно-серого цвета. При росте на твердых и жидких питательных средах штамм хорошо усваивал мочевины, сернокислый аммоний, нитрат натрия. Штамм желатину разжижает, крахмал гидролизует, сбраживает глюкозу, мальтозу, декстрин, фруктозу, сахарозу, крахмал с образованием кислоты гидролизует молоко. Реакция Фогес-Проснауэра положительная: продуцирует ацетилметилкарбинол.

Штамм *Bacillus subtilis* 534 проявляет антагонистические свойства в отношении следующих тест-организмов: *Escherichia coli* K12 (ATCC 25922), *Escherichia coli* 354, *Staphylococcus aureus* P 209 (ATCC 6538- 452, *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Pseudomonas fluorescens* ВКПМ В-350, *Pseudomonas putida* КМ МГУ 95, *Candida albicans* 54 (рис.).



Антагонистическая активность *Bacillus subtilis* 534

Амилолитическая, протеолитическая, целлюлолитическая и липолитическая активность культуральной жидкости *Bacillus subtilis* 534 обнаруживается уже через 24 часа роста: α -амилазы – 10 ед/мл, протеазы – 4,5 ед/мл, целлюлазы – 0,2 ед/мл и липазы – 110 ед/мл. Культивирование штамма *Bacillus subtilis* 534 на дренажной воде птицефабрики в биореакторах

аэробного типа позволило улучшить их санитарные показатели. В процессе аэробного культивирования в течение 24 часов происходили существенные изменения химического состава сточной воды: уменьшилось содержание взвешенных веществ, жиров, снизились показатели ХПК, БПК_{полн.} (табл. 1).

Таблица 1

Состав дренажной воды птицефабрики исходной и после 24-часового культивирования *Bacillus subtilis* 534

Показатель	Ед. изм.	Исходная сточная вода	После 24 часов культивирования
Взвешенные в-ва	мг/дм ³	1200	800
Жиры	мг/дм ³	500	250
*ХПК	мг O ₂ /дм ³	10300	6700
**БПК _{полн.}	мг O ₂ /дм ³	5900	2200
***Коли-титр	мл	≥0,001	0,05
****ОМЧ	КОЕ/мл	9*10 ⁶	9*10 ⁵

Примечание: * – химическое потребление кислорода мг O₂/л; ** – биологическое потребление кислорода мг O₂/л; *** – коли-титр – это наименьший объем воды, содержащий кишечную палочку; **** – общее микробное число.

Полученный в процессе компостирования полужидкой и твердой фазы помета продукт представлял собой однородную гомогенную сыпучую массу светло-коричневого цвета. В контрольном варианте, без предварительной обработки, пометная масса имела прежний грязно-зеленый цвет с резким запахом и за указанный период не претерпевала никаких изменений.

Эффективность полученного органического продукта испытывали в процессе выращивания

районированного сорта нута Краснокутский-36 в лабораторных и полевых условиях. Проверка эффективности для использования в качестве удобрения при выращивании семян нута показала целесообразность использования полученного органического продукта в качестве удобрения. Данные таблицы 2 свидетельствуют о положительном влиянии на всхожесть семян нута до 97 % (что выше по сравнению с контролем на 17 %) и повышении урожайности на 32,0 %.

Таблица 2

Всхожесть семян и урожайность нута сорта Краснокутский 36

Вариант опыта	Всхожесть семян, %	Урожайность средняя (2017–2019 гг.)
Контроль	80	9,7
Органический продукт	97	12,8
НСР ₀₅ 3,4ц/га		

Заключение. Таким образом, штамм бактерии *Bacillus subtilis* 534, благодаря способности к синтезу гидролитических ферментов, нетоксичности, непатогенности, своими антагонистическими свойствами в отношении патогенных микроорганизмов может быть использован для получения биоудобрения.

Литература

1. Левин Е.В., Сагитов Р.Ф., Гамм Т.А. [и др.]. Воздействие помехохранилища бывшей птицефабрики «Снежная» Мурманской области на поверхностные воды // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. 2017. Т. 3 (65). С. 210–212.

2. *Лысенко В.П.* Перспективные технолог переработки помета путем ферментац под влиянием присутствующих в помете микроорганизмов // *Птицеводство*. 2011. Т. 1. С. 52–54.
3. *Уваров Р.А., Брюханов А.Ю.* Перспективные технологии биоферментации навоза/помета для северо-запада России // *Научное обозрение*. 2015. Т. 16. С. 26–31.
4. *Уваров Р.А.* Биоферментация помета в установках закрытого типа // *Птицеводство*. 2016. Т.10. С. 53–56.
5. *Нетрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М.* [и др.]. Практикум по микробиологии: учеб. пособие. М.: Академия. 2005. 608 с.
6. *Семена сельскохозяйственных культур. Методы анализа: сб. ГОСТов.* М.: Изд-во стандартов, 2004.
7. *Никитенко М.В., Никитенко В.И.* Патент РФ № 2217154.2003. Препарат споробактерин жидкий. Оpubл. 27.11.2003
8. *Manachini P.L., Fortina M.G., Parini C.* Thermostable alkaline protease produced by *Bacillus termoruber*-new species of *Bacillus* // *Appl.Microbiol.Biotechnol.* 1988.V. 28(4/6). P. 409-413.
9. *Егоров Н.С.* Основы учения об антибиотиках. М.: Наука, 2004. 528 с.

Literatura

1. *Levin E.V., Sagitov R.F., Gamm T.A.* [i dr.]. Vozdejstvie pometohranilishha byvshej pticefabriki «Snezhnaja» Murmanskoy oblasti na poverhnostnye vody // *Izvestija Orenburgskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta*. 2017. Т. 3 (65). S. 210–212.
2. *Lysenko V.P.* Perspektivnye tehnologii pererabotki pometa putem fermentacii pod vlijaniem prisutstvujushhих v pomete mikroorganizmov // *Pticevodstvo*. 2011. Т. 1. S. 52–54.
3. *Uvarov R.A., Brjuhanov A.Ju.* Perspektivnye tehnologii biofermentacii navoza/pometa dlja severo-zapada Rossii // *Nauchnoe obozrenie*. 2015. Т. 16. S. 26–31.
4. *Uvarov R.A.* Biofermentacija pometa v ustanovkah zakrytogo tipa // *Pticevodstvo*. 2016. Т.10. S. 53–56.
5. *Netrusov A.I., Egorova M.A., Zaharchuk L.M.* [i dr.]. Praktikum po mikrobiologii: ucheb. posobie. M.: Akademija. 2005. 608 s.
6. *Семена sel'skhozajstvennyh kul'tur. Metody analiza: sb. GOSTov.* М.: lzd-vo standartov, 2004.
7. *Nikitenko M.V., Nikitenko V.I.* Patent RF № 2217154.2003. Preparat sporobakterin zhidkij. Opubl. 27.11.2003.
8. *Manachini P.L., Fortina M.G., Parini C.* Thermostable alkaline protease produced by *Bacillus termoruber*-new species of *Bacillus* // *Appl.Microbiol.Biotechnol.* 1988.V. 28(4/6). P.409-413.
9. *Egorov N.S.* Osnovy uchenija ob antibiotikah. M: Nauka, 2004. 528s.

