

Скрининг микроорганизмов, способных ускорять процесс микробной трансформации птичьего помета

А. В. Лунева¹✉

¹ Кубанский государственный аграрный университет имени И. Т. Трубилина, Краснодар, Россия

✉ E-mail: albina.luneva@mail.ru

Аннотация. Цель исследований – скрининг коллекционных штаммов микроорганизмов, обладающих ферментативными свойствами для ускорения процессов микробного биоразложения птичьего помета. **Методы исследований.** Изучали протеолитическую активность выращенных культур согласно ГОСТ 20264.2-88, анализировали общее микробное число в курином помете (КОЕ/мл), определяли аммонийный азот. **Результаты исследований.** В результате проведенных экспериментов установлено, что самую высокую протеолитическую активность (74,6 ед/г) продемонстрировал штамм *Pseudomonas putida* 90 биовар А (171). При анализе действия исследуемых коллекционных штаммов на процессы разложения помета выявлено, что наибольшее количество микробных клеток в птичьем помете было достигнуто при использовании *Pseudomonas putida* 90 биовар А (171): на начало исследований оно составляло 10^4 КОЕ/мл, а к 15-м суткам было максимальным и составило 10^{11} КОЕ/мл. Содержание аммонийного азота в обработанном данной культурой помете с 340 мг/л от начала эксперимента снизилось до 174 и 169 мг/л на 15-е и 20-е сутки соответственно, что было наилучшим показателем. При подборе дозы и концентрации штамма-продуцента *Pseudomonas putida* 90 биовар А (171) для внесения в птичий помет установлено, что для ускорения процесса биодеструкции птичьего помета оптимальной дозой внесения исследуемой культуры является 4,0 % от массы органического отхода при предварительном разбавлении в 2 раза водой. При этом оптимальное время выдержки помета и исследуемой культуры составляет 15 суток. **Научная новизна.** Впервые установлено, что при обработке куриного помета коллекционным штаммом *Pseudomonas putida* 90 биовар А (171) ускоряется процесс его микробной трансформации.

Ключевые слова: подбор, коллекционные микроорганизмы, *Pseudomonas*, *Bacillus*, протеолитическая активность, куриный помет, соотношение, биоразложение, аммонийный азот, общее микробное число, время обработки, доза внесения.

Для цитирования: Лунева А. В. Скрининг микроорганизмов, способных ускорять процесс микробной трансформации птичьего помета // Аграрный вестник Урала. 2021. № 12 (215). С. 50–58. DOI: 10.32417/1997-4868-2021-215-12-50-58.

Дата поступления статьи: 26.08.2021, **дата рецензирования:** 25.10.2021, **дата принятия:** 12.11.2021.

Постановка проблемы (Introduction)

В последние годы индустрия птицеводства быстро расширилась не только на территории Российской Федерации, но и по всему миру из-за растущего спроса на продукты животноводства, что, несомненно, привело к увеличению накопления продуктов жизнедеятельности сельскохозяйственной птицы на промышленных предприятиях в десятки раз [1, с. 4953], [2, с. 25], [3, с. 218], [4, с. 33], [5, с. 6]. Массовые отложения помета сельскохозяйственной птицы вызывают серьезные экологические проблемы, включая неприятный запах, загрязнение почвы и воды, а также распространение устойчивости к антибиотикам условно-патогенных и патогенных микроорганизмов, что представляет большую угрозу для здоровья человека [6, с. 135], [7, с. 5], [8, с. 65], [9, с. 70]. Поэтому

крайне важно продолжать поиск эффективных методов биобезопасности при переработке птичьего помета [10, с. 14].

Компостирование может преобразовывать органические сельскохозяйственные и промышленные отходы в биоудобрения без вреда для окружающей среды и является многообещающим методом удаления отходов промышленного производства [11, с. 3], [12, с. 34]. В процессе компостирования микробные сообщества играют самую важную роль в разложении органических материалов до легкоусвояемых компонентов [13, с. 1].

Общеизвестно, что птичий помет содержит высокое количество азотных компонентов, в частности белков, что обусловлено спецификой кормовых смесей, присутствующих в рационах сельскохозяйствен-

ной птицы [14, с. 60]. В этой связи поиск микроорганизмов, обладающих высокой протеолитической активностью, способных расщеплять и ускорять биодеградацию белка птичьего помета на более простые органические соединения, которые впоследствии, находясь в более доступной форме, будут использоваться аборигенной микрофлорой помета, что обеспечит наилучший технологический эффект утилизации, является перспективной задачей в сфере промышленного птицеводства [15, с. 29].

Целью научно-исследовательской работы является поиск коллекционных штаммов микроорганизмов, обладающих протеолитическими свойствами для ускорения процессов микробного биоразложения продуктов жизнедеятельности сельскохозяйственной птицы (птичьего помета).

Методология и методы исследования (Methods)

Научно-исследовательская работа осуществлялась в лабораториях кафедр биотехнологии, биохимии и биофизики, а также паразитологии, ветсанэкспертизы и зоогигиены и базах при Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Кубанский государственный

аграрный университет имени И. Т. Трубилина»: научно-исследовательский институт прикладной и экспериментальной экологии, а также научно-испытательный центр токсико-фармакологических исследований и разработки лекарственных средств ветеринарного применения, кормовых добавок и дезинфектантов (НИЦ Ветфармбиоцентр).

Культуры коллекционных штаммов микроорганизмов, используемых в научно-исследовательских экспериментах, представлены в таблице 1.

Объектом, на который было направлено действие исследуемых микробных коллекционных культур, являлся куриный нативный помет.

При подборе коллекционного штамма, обладающего наилучшими свойствами биоразложения помета, проводили изучение протеолитической активности выращенных культур согласно ГОСТ 20264.2-88, в экспериментах на курином помете, обработанном исследуемыми микроорганизмами, анализировали общее микробное число путем высевов на мясопептонный агар (КОЕ/мл) и содержание аммонийного азота в трех повторностях [16, с. 321–333].

Таблица 1

Коллекционные штаммы микроорганизмов, используемые в научно-исследовательской работе

Область применения штамма/ синтезируемый продукт	Место взятия штамма	
	Коллекция КубГАУ	Коллекция ВКПМ*
Деструктор ароматических соединений	<i>Pseudomonas putida</i> ATCC 12633	<i>Pseudomonas putida</i> 90 биовар А (171)
Протеаза нейтральная	–	<i>Bacillus megaterium</i> BM-11
		<i>Bacillus subtilis</i> 203
		<i>Bacillus subtilis</i> 103
Протеаза щелочная	–	<i>Bacillus subtilis</i> 310
		<i>Bacillus subtilis</i> «ВНИИгенетика 90»
Протеолитические ферменты	–	<i>Bacillus licheniformis</i> Л-34
		<i>Bacillus mesentericus</i> В-2466
		<i>Bacillus subtilis</i> «ВНИИгенетика-45»

* Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов.

Table 1

Collection strains of microorganisms used in research work

Scope of the strain / synthesized product	Place of taking the strain	
	KubSAU collection	ARCIM* collection
Destructor of aromatic compounds	<i>Pseudomonas putida</i> ATCC 12633	<i>Pseudomonas putida</i> 90 biovar A (171)
Protease neutral	–	<i>Bacillus megaterium</i> BM-11
		<i>Bacillus subtilis</i> 203
		<i>Bacillus subtilis</i> 103
Alkaline protease	–	<i>Bacillus subtilis</i> 310
		<i>Bacillus subtilis</i> “VNIIGenetics 90”
Proteolytic enzymes	–	<i>Bacillus licheniformis</i> L-34
		<i>Bacillus mesentericus</i> B-2466
		<i>Bacillus subtilis</i> “VNIIGenetics-45”

* Russian collection of industrial microorganisms.

Экспресс-анализ на возможность проявления протеолитических свойств проводили с применением метода полимеразной цепной реакции (ПЦР), используя в качестве матрицы тотальную ДНК отобранных чистых штаммов и праймеры, комплементарные последовательностям генов, кодирующих протеазы, подобные протеолитическим ферментам, в частности, сериновые, аспаргатные, треониновые, глутаминовые, цистеиновые, металлопротеазы и аспарагин.

Результаты (Results)

Культуры микроорганизмов были выбраны с учетом предыдущего опыта, их термотолерантности и назначения. Каждая из привлеченных групп микроорганизмов ответственна за решение определенной задачи: разрушение сложных веществ до легкодоступных субстратов, разложение органического вещества с высвобождением аммонийного азота для последующего перевода его в доступную для растений форму, подавление развития патогенной микрофлоры, консервация питательных веществ образующегося компоста и т. д.

В ходе экспериментальных исследований на первом этапе проводили изучение протеолитической активности взятых для опытов культур микроорганизмов. Результаты протеолитической активности исследуемых коллекционных штаммов представлены в таблице 2.

Результаты изучения ферментативной активности показали, что все штаммы обладают протеолитическими свойствами, так как в той или иной степени продуцировали протеазы. Из штаммов, которые продемонстрировали высокую протеолитическую активность, следует выделить *Pseudomonas putida* 90 биовар А (171), *Pseudomonas putida* ATCC 12633, *Bacillus licheniformis* Л-34 и *Bacillus mesentericus* В-2466. Однако наибольшую протеолитическую активность продемонстрировал штамм *Pseudomonas putida* 90 биовар А (171): она составила 74,6 ед/г, что было выше, чем у *Bacillus licheniformis* Л-34, на 12,9 ед/г, *Pseudomonas putida* ATCC 12633 на 16,4 ед/г и *Bacillus mesentericus* В-2466 – на 19,4 ед/г.

Также для подбора наиболее перспективного штамма по молекулярно-генетическим свойствам проводилось изучение в бактериальном геноме исследуемых культур микроорганизмов генов, кодирующих протеазы различных групп, с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР). Был проведен экспресс-анализ наличия в тотальной ДНК исследуемых коллекционных штаммов, генов, схожих с последовательностями семи важных групп протеолитических ферментов (в частности, сериновые, аспаргатные, треониновые, глутаминовые, цистеиновые, металлопротеазы и аспарагин), с использованием специфических праймеров.

Таблица 2

Протеолитическая активность экспериментальных штаммов

Штамм-продуцент	Протеолитическая активность, ед/г
<i>Pseudomonas putida</i> ATCC 12633	58,2 ± 2,2
<i>Pseudomonas putida</i> 90 биовар А (171)	74,6 ± 3,1
<i>Bacillus megaterium</i> ВМ-11	20,2 ± 0,8
<i>Bacillus subtilis</i> 203	39,4 ± 1,7
<i>Bacillus subtilis</i> 103	45,7 ± 1,9
<i>Bacillus subtilis</i> 310	49,3 ± 1,9
<i>Bacillus subtilis</i> «ВНИИгенетика 90»	40,4 ± 1,6
<i>Bacillus licheniformis</i> Л-34	61,7 ± 2,8
<i>Bacillus mesentericus</i> В-2466	55,2 ± 2,3
<i>Bacillus subtilis</i> «ВНИИгенетика-45»	43,3 ± 2,1

Table 2

Proteolytic activity of experimental strains

Producing strain	Proteolytic activity, units / g
<i>Pseudomonas putida</i> ATCC 12633	58.2 ± 2.2
<i>Pseudomonas putida</i> 90 biovar A (171)	74.6 ± 3.1
<i>Bacillus megaterium</i> ВМ-11	20.2 ± 0.8
<i>Bacillus subtilis</i> 203	39.4 ± 1.7
<i>Bacillus subtilis</i> 103	45.7 ± 1.9
<i>Bacillus subtilis</i> 310	49.3 ± 1.9
<i>Bacillus subtilis</i> «VNIIGenetics 90»	40.4 ± 1.6
<i>Bacillus licheniformis</i> L-34	61.7 ± 2.8
<i>Bacillus mesentericus</i> В-2466	55.2 ± 2.3
<i>Bacillus subtilis</i> «VNIIGenetics-45»	43.3 ± 2.1

Зависимость биоконверсии куриного помета от времени обработки и используемой культуры микроорганизма

Коллекционный штамм-продуцент	Время исследований, сутки													
	0		5		10		15		20		25		30	
	Анализируемый показатель													
	ОМЧ, кл/г	Аммонийный азот, мг/л	ОМЧ, кл/г	Аммонийный азот, мг/л	ОМЧ, кл/г	Аммонийный азот, мг/л	ОМЧ, кл/г	Аммонийный азот, мг/л	ОМЧ, кл/г	Аммонийный азот, мг/л	ОМЧ, кл/г	Аммонийный азот, мг/л	ОМЧ, кл/г	Аммонийный азот, мг/л
<i>Pseudomonas putida</i> ATCC 12633	10 ⁴	340	10 ⁵	302	10 ⁶	264	10 ⁹	174	10 ⁹	169	10 ⁹	170	10 ⁸	172
<i>Pseudomonas putida</i> 90 биовар А (171)	10 ⁴	340	10 ⁶	281	10 ⁸	228	10 ¹¹	132	10 ¹¹	130	10 ¹¹	134	10 ¹⁰	129
<i>Bacillus megaterium</i> ВМ-11	10 ⁴	340	10 ⁴	334	10 ⁴	323	10 ⁵	307	10 ⁵	303	10 ⁵	304	10 ⁵	301
<i>Bacillus subtilis</i> 203	10 ⁴	340	10 ⁴	321	10 ⁴	304	10 ⁵	304	10 ⁵	296	10 ⁵	289	10 ⁵	294
<i>Bacillus subtilis</i> 103	10 ⁴	340	10 ⁴	326	10 ⁴	305	10 ⁵	305	10 ⁵	304	10 ⁵	298	10 ⁵	302
<i>Bacillus subtilis</i> 310	10 ⁴	340	10 ⁴	317	10 ⁵	297	10 ⁶	288	10 ⁶	283	10 ⁶	290	10 ⁶	289
<i>Bacillus subtilis</i> ВНИИгенетика 90	10 ⁴	340	10 ⁴	330	10 ⁴	320	10 ⁵	320	10 ⁵	314	10 ⁵	310	10 ⁵	312
<i>Bacillus licheniformis</i> Л-34	10 ⁴	340	10 ⁵	311	10 ⁶	295	10 ⁶	295	10 ⁷	273	10 ⁶	261	10 ⁵	254
<i>Bacillus mesentericus</i> В-2466	10 ⁴	340	10 ⁴	319	10 ⁵	298	10 ⁶	298	10 ⁷	276	10 ⁶	271	10 ⁶	268
<i>Bacillus subtilis</i> ВНИИгенетика-45	10 ⁴	340	10 ⁴	326	10 ⁵	312	10 ⁵	312	10 ⁵	305	10 ⁵	301	10 ⁵	297
Помет без обработки	10 ⁴	340	10 ⁴	341	10 ⁴	339	10 ⁴	338	10 ⁴	341	10 ⁴	338	10 ⁴	335

Table 3
Dependence of the bioconversion of chicken manure on the time of treatment and the culture of the microorganism used

Collectible strain	Research time, days													
	0		5		10		15		20		25		30	
	Analyzed indicator													
	ТМС*, cell/g	AN**, mg/l	ТМС*, cell/g	AN**, mg/l	ТМС*, cell/g	AN**, mg/l	ТМС*, cell/g	AN**, mg/l	ТМС*, cell/g	AN**, mg/l	ТМС*, cell/g	AN**, mg/l	ТМС*, cell/g	AN**, mg/l
<i>Pseudomonas putida</i> ATCC 12633	10 ⁴	340	10 ⁵	302	10 ⁶	264	10 ⁹	174	10 ⁹	169	10 ⁹	170	10 ⁸	172
<i>Pseudomonas putida</i> 90 biovar А (171)	10 ⁴	340	10 ⁶	281	10 ⁸	228	10 ¹¹	132	10 ¹¹	130	10 ¹¹	134	10 ¹⁰	129
<i>Bacillus megaterium</i> ВМ-11	10 ⁴	340	10 ⁴	334	10 ⁴	323	10 ⁵	307	10 ⁵	303	10 ⁵	304	10 ⁵	301
<i>Bacillus subtilis</i> 203	10 ⁴	340	10 ⁴	321	10 ⁴	304	10 ⁵	304	10 ⁵	296	10 ⁵	289	10 ⁵	294
<i>Bacillus subtilis</i> 103	10 ⁴	340	10 ⁴	326	10 ⁴	305	10 ⁵	305	10 ⁵	304	10 ⁵	298	10 ⁵	302
<i>Bacillus subtilis</i> 310	10 ⁴	340	10 ⁴	317	10 ⁵	297	10 ⁶	288	10 ⁶	283	10 ⁶	290	10 ⁶	289
<i>Bacillus subtilis</i> «VNIIGenetics 90»	10 ⁴	340	10 ⁴	330	10 ⁴	320	10 ⁵	320	10 ⁵	314	10 ⁵	310	10 ⁵	312
<i>Bacillus licheniformis</i> L-34	10 ⁴	340	10 ⁵	311	10 ⁶	295	10 ⁶	295	10 ⁷	273	10 ⁶	261	10 ⁵	254
<i>Bacillus mesentericus</i> В-2466	10 ⁴	340	10 ⁴	319	10 ⁵	298	10 ⁶	298	10 ⁷	276	10 ⁶	271	10 ⁶	268
<i>Bacillus subtilis</i> «VNIIGenetics-45»	10 ⁴	340	10 ⁴	326	10 ⁵	312	10 ⁵	312	10 ⁵	305	10 ⁵	301	10 ⁵	297
Litter without treatment	10 ⁴	340	10 ⁴	341	10 ⁴	339	10 ⁴	338	10 ⁴	341	10 ⁴	338	10 ⁴	335

* Total microbial count. ** Ammonium nitrogen.

Проведенные исследования выявили положительные сигналы для всех анализируемых культур микроорганизмов, но в различной степени: у *Pseudomonas putida* ATCC 12633 – серин-, аспаргат-, глутамин-, цистеин- и металлопротеазподобные гены; *Pseudomonas putida* 90 биовар А (171) – серин-, аспаргат-, треонин-,

глутамин-, цистеин-, металлопротеаз- и аспарагинподобные гены; *Bacillus megaterium* ВМ-11 – треонин- и цистеинподобные гены; *Bacillus subtilis* 203 – серин-, аспаргат- и глутаминподобные гены; *Bacillus subtilis* 103 – серин-, аспаргат- и глутаминподобные гены; *Bacillus subtilis* 310 – серин-, аспаргат-, глутамин- и

цистеинподобные гены; *Bacillus subtilis* «ВНИИГенетика 90» – серин-, глутамин- и цистеинподобные гены; *Bacillus licheniformis* Л-34 – серин-, аспарат-, треонин-, глутамин-, цистеин-, и аспарагинподобные гены; *Bacillus mesentericus* В-2466 – серин-, аспарат-, треонин-, глутамин- и цистеинподобные гены; *Bacillus subtilis* «ВНИИГенетика-45» – серин-, аспарат-, глутамин- и цистеинподобные гены. Полученные результаты говорят о большей предпочтительности использования в качестве штамма-деструктора культуры *Pseudomonas putida* 90 бивар А (171), так как в структуре его тотальной ДНК были выявлены гены, кодирующие протеолитические ферменты семи различных групп.

Проводилось изучение действия культур исследуемых микроорганизмов на биоразложение куриного помета бесподстилочного содержания в течение 30 дней, при этом в качестве анализируемых показателей каждые пять дней регистрировались общее микробное число (ОМЧ) и содержание аммонийного азота. Для исследований использовали активную микробную культуру взятых для экспериментов штаммов с титром клеток не менее 10^9 КОЕ/мл. Доза внесения штаммов-продуцентов для скрининга составляла 10,0 % от массы побочного продукта. Зависимость биоконверсии куриного помета от времени обработки и используемой культуры микроорганизма представлена в таблице 3.

Таблица 4
Зависимость биоразложения помета от времени обработки и дозы микробной культуры *Pseudomonas putida* 90 бивар А (171)

Доза внесения, %	Время исследований, сутки													
	0		5		10		15		20		25		30	
	Анализируемый показатель													
	ОМЧ, кл/г	Аммонийный азот, мг/л	ОМЧ, кл/г	Аммонийный азот, мг/л	ОМЧ, кл/г	Аммонийный азот, мг/л	ОМЧ, кл/г	Аммонийный азот, мг/л	ОМЧ, кл/г	Аммонийный азот, мг/л	ОМЧ, кл/г	Аммонийный азот, мг/л	ОМЧ, кл/г	Аммонийный азот, мг/л
1,0	10^4	319	10^5	303	10^6	273	10^7	227	10^8	201	10^8	198	10^7	206
2,0	10^4	319	10^6	296	10^7	259	10^8	206	10^9	201	10^9	194	10^9	193
3,0	10^4	319	10^6	285	10^8	215	10^{10}	179	10^{10}	164	10^{10}	160	10^9	155
4,0	10^4	319	10^6	278	10^9	211	10^{11}	132	10^{11}	130	10^{10}	131	10^{10}	133
5,0	10^4	319	10^7	277	10^9	214	10^{11}	130	10^{11}	127	10^{11}	135	10^{10}	131
10,0	10^4	319	10^7	274	10^9	207	10^{11}	126	10^{11}	125	10^{11}	130	10^{11}	132
Помет без обработки	10^4	319	10^4	318	10^4	315	10^4	317	10^4	316	10^4	312	10^5	309

Table 4
Dependence of litter biodegradation on treatment time and dose of microbial culture *Pseudomonas putida* 90 biovar A (171)

Application dose, %	Research time, days													
	0		5		10		15		20		25		30	
	Analyzed indicator													
	TMC*, cell/g	AN**, mg/l	TMC*, cell/g	AN**, mg/l	TMC*, cell/g	AN**, mg/l	TMC*, cell/g	AN**, mg/l	TMC*, cell/g	AN**, mg/l	TMC*, cell/g	AN**, mg/l	TMC*, cell/g	AN**, mg/l
1,0	10^4	319	10^5	303	10^6	273	10^7	227	10^8	201	10^8	198	10^7	206
2,0	10^4	319	10^6	296	10^7	259	10^8	206	10^9	201	10^9	194	10^9	193
3,0	10^4	319	10^6	285	10^8	215	10^{10}	179	10^{10}	164	10^{10}	160	10^9	155
4,0	10^4	319	10^6	278	10^9	211	10^{11}	132	10^{11}	130	10^{10}	131	10^{10}	133
5,0	10^4	319	10^7	277	10^9	214	10^{11}	130	10^{11}	127	10^{11}	135	10^{10}	131
10,0	10^4	319	10^7	274	10^9	207	10^{11}	126	10^{11}	125	10^{11}	130	10^{11}	132
Litter without treatment	10^4	319	10^4	318	10^4	315	10^4	317	10^4	316	10^4	312	10^5	309

* Total microbial count. ** Ammonium nitrogen.

По результатам исследований установлено, что наибольшее количество микробных клеток в птичьем помете достигнуто при использовании микробной культуры *Pseudomonas putida* 90 биовар А (171): от начала исследований оно было 10^4 КОЕ/мл, к 15-м суткам составило 10^{11} КОЕ/мл, а далее титр микрофлоры во всех случаях перестал повышаться, что, скорее всего, обусловлено прекращением действия ферментного комплекса протеолитических микроорганизмов, обеспечивающего активное питание как аборигенной, так и исследуемой микробной культуры (таблица 3).

При анализе содержания аммонийного азота в курином помете выявлено максимальное уменьшение исследуемого показателя к 15–20-м суткам от начала обработки, что коррелирует с динамикой увеличения общего числа микроорганизмов. Наименьший уровень аммонийного азота был зафиксирован при обработке помета микробной культурой *Pseudomonas putida* 90 биовар А (171), данный показатель с 340 мг/л от начала обработки снизился до 174 и 169 мг/л.

Анализируемые показатели куриного помета, не обработанного микробной культурой, в течение эксперимента существенно не изменились.

Таким образом, результаты исследований показали, что наиболее перспективной культурой для биоконверсии куриного помета из исследуемых коллекционных штаммов является протеолитический штамм-продуцент *Pseudomonas putida* 90 биовар А (171), при этом по предварительным данным установлено, что оптимальное время выдерживания побочной продукции птицеводства, обработанной данной культурой, составляет 15–20 дней.

Следующим этапом исследований являлся подбор дозы внесения протеолитической культуры *Pseudomonas putida* 90 биовар А (171) в бесподстилочный нативный куриный помет. Доза внесения культуры варьировала от 1,0 до 5,0 %, максимально используемая в предварительных исследованиях – 10,0 %. Титр клеток был максимальным и составлял не менее 10^9 КОЕ/мл. Результаты исследований продемонстрированы в таблице 4.

Таблица 5
Зависимость биоразложения помета от времени обработки и концентрации культуры *Pseudomonas putida* 90 биовар А (171)

Штамм-продуцент: вода	Время исследований, сутки													
	0		5		10		15		20		25		30	
	Анализируемый показатель													
	ОМЧ, кл/г	Аммонийный азот, мг/л	ОМЧ, кл/г	Аммонийный азот, мг/л	ОМЧ, кл/г	Аммонийный азот, мг/л	ОМЧ, кл/г	Аммонийный азот, мг/л	ОМЧ, кл/г	Аммонийный азот, мг/л	ОМЧ, кл/г	Аммонийный азот, мг/л	ОМЧ, кл/г	Аммонийный азот, мг/л
Без разбавления	10^4	332	10^6	279	10^9	207	10^{11}	128	10^{11}	132	10^{11}	130	10^{10}	137
1:2	10^4	332	10^6	285	10^9	202	10^{11}	131	10^{11}	130	10^{11}	135	10^{10}	132
1:3	10^4	332	10^5	289	10^8	210	10^{11}	133	10^{11}	135	10^{10}	139	10^{10}	136
1:4	10^4	332	10^5	297	10^7	259	10^9	224	10^9	219	10^9	218	10^8	222
1:5	10^4	332	10^5	310	10^6	288	10^7	276	10^7	277	10^8	252	10^8	250
Помет без обработки	10^4	332	10^4	333	10^4	330	10^4	332	10^4	329	10^4	330	10^4	327

Table 5
Dependence of litter biodegradation on treatment time and culture concentration *Pseudomonas putida* 90 biovar A (171)

Producing strain: water	Research time, days													
	0		5		10		15		20		25		30	
	Analyzed indicator													
	TMC*, cell/g	AN**, mg/l	TMC*, cell/g	AN**, mg/l	TMC*, cell/g	AN**, mg/l	TMC*, cell/g	AN**, mg/l	TMC*, cell/g	AN**, mg/l	TMC*, cell/g	AN**, mg/l	TMC*, cell/g	AN**, mg/l
Without dilution with water	10^4	332	10^6	279	10^9	207	10^{11}	128	10^{11}	132	10^{11}	130	10^{10}	137
1:2	10^4	332	10^6	285	10^9	202	10^{11}	131	10^{11}	130	10^{11}	135	10^{10}	132
1:3	10^4	332	10^5	289	10^8	210	10^{11}	133	10^{11}	135	10^{10}	139	10^{10}	136
1:4	10^4	332	10^5	297	10^7	259	10^9	224	10^9	219	10^9	218	10^8	222
1:5	10^4	332	10^5	310	10^6	288	10^7	276	10^7	277	10^8	252	10^8	250
Litter without treatment	10^4	332	10^4	333	10^4	330	10^4	332	10^4	329	10^4	330	10^4	327

* Total microbial count. ** Ammonium nitrogen.

При анализе зависимости биоразложения помета от времени обработки и дозы микробной культуры *Pseudomonas putida* 90 биовар А (171) установлено, что разница между общим микробным числом и содержанием аммонийного азота при внесении штамма в дозах 4,0; 5,0 и 10,0 % была незначительной, а максимальное и минимальное значения исследуемых показателей (ОМЧ и уровень аммонийного азота) приходилось на 15–20-е сутки эксперимента. Значимых изменений в курином помете без обработки микробной культурой по показателям ОМЧ и аммонийного азота не выявлено.

Таким образом, с учетом полученных результатов оптимальным значением внесения микробной культуры *Pseudomonas putida* 90 биовар А (171) была принята доза 4,0 % от массы куриного помета, время выдержки – 15 дней.

Интересно было установить влияние концентрации вносимой протеолитической культуры *Pseudomonas putida* 90 биовар А (171) в куриный помет. Для постановки эксперимента микробная культура *Pseudomonas putida* 90 биовар А (171) в титре не менее 10^9 КОЕ/мл и дозе 4,0 % перед внесением в куриный помет разбавлялась водой в различных соотношениях. Результаты исследований представлены в таблице 5.

Результаты зависимости биоконверсии куриного помета от времени обработки и концентрации клеток культуры *Pseudomonas putida* 90 биовар А (171) показали, что значения общего микробного числа и аммонийного азота в эксперименте, где протеолитическую культуру разбавляли с водой в соотношении 1:3, не имели значительных различий по сравнению с опытными партиями, где использовали неразбавленную культуру и разведенную в соотношении 1:2 (таблица 5). Разбавление микробной культуры *Pseudomonas putida* 90 биовар А

(171) водой в 4 и 5 раз привело к снижению ОМЧ и аммонийного азота. Однако с учетом планируемой технологии применения биопрепарата, подразумевающей применение двух жидких микробных композиций, для дальнейших исследований целесообразней использовать микробную культуру *Pseudomonas putida* 90 биовар А (171) разведенную водой в соотношении 1:2, чтобы получить максимальный и оптимальный ожидаемый технологический результат. Также следует отметить, что наилучшее значение анализируемых показателей приходилось на 15-е сутки исследований. Помет кур, не обработанный исследуемой культурой, изменений не претерпел.

Обсуждение и выводы (Discussion and Conclusion)

Комплекс проведенных научно-исследовательских экспериментов продемонстрировал, что коллекционный штамм *Pseudomonas putida* 90 биовар А (171) перспективен, обладает высокой протеолитической активностью, способен участвовать в процессе биодеструкции куриного помета, оптимальной дозой внесения подобранного штамма является 4,0 % от массы побочного продукта птицеводческой промышленности (с предварительным разведением микробной культуры водой в 2 раза), время выдержки – 15 дней. *Pseudomonas putida* 90 биовар А (171) может быть рекомендована в качестве компонента при разработке биопрепарата-деструктора для ускорения процесса разложения продуктов жизнедеятельности сельскохозяйственной птицы, в частности птичьего помета.

Благодарности (Acknowledgements)

Исследование выполнено при финансовой поддержке Кубанского научного фонда и Организации в рамках научного проекта МФИ-П-20.1-43/20 от 07.12.2020 г.

Библиографический список

1. Ulimbashev M. B., Temmoev M. I., Konik N. V., Koshchaev A. G., Luneva A. V., Neverova O. P., Saleeva I. P. A new method of biological disposal of poultry droppings // International Journal of Engineering and Advanced Technology. 2019. V. 9. No. 1. Pp. 4953–4956. DOI: 10.35940/ijeat.A2107.109119.
2. Lysenko Yu. A., Koshchaev A. G., Luneva A. V., Omarov R. S., Shlykov S. N. Organic meat production of broiler chickens Hubbard Redbro Cross // International Journal of Veterinary Science. 2021. Vol. 10. No. 1. Pp. 25–30. DOI: 10.47278/journal.ijvs/2020.021.
3. Шантыз А. Х., Еганян Е. С., Лунева А. В., Жолобова И. С., Марченко Е. Ю., Лысенко Ю. А. Эффективность применения кормовой добавки в рационе цыплят-бройлеров при изучении ее фармакологических свойств // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н. Э. Баумана. 2021. Т. 245. № 1. С. 218–223.
4. Фисинин В. И., Буяров В. С., Буяров А. В., Шуметов В. Г. Мясное птицеводство в регионах России: современное состояние и перспективы инновационного развития // Аграрная наука. 2018. № 2. С. 30–38.
5. Маргынова Е. И. РОСПТИЦЕСОЮЗ: Итоги 2020 г. подведены и новые цели обозначены // Птица и птицепродукты. 2021. № 1. С. 6–7.
6. Фисинин В. И. Мировое и российское птицеводство: реалии и вызовы будущего: монография. Москва : Хлебпродинформ, 2019. 470 с.
7. Маргынова Е. И., Мотина Н. В., Бладыко Н. А. Итоги выставки «ПРОДЭКСПО-2021» // Птица и птицепродукты. 2021. № 3. С. 5–7.
8. Ройтер Л. М., Веденкина Н. А., Еремеева И. В. Аналитические инструменты в оценке рыночного потенциала птицеводства // Птица и птицепродукты. 2021. № 4. С. 64–68.

9. Ройтер Л. М., Еремеева Н. А., Павлова И. М. Рыночный потенциал мяса птицы // Экономика сельского хозяйства России. 2020. № 3. С. 69–79. DOI: 10.32651/203-69.
10. Будрик В. Г., Козак С. С., Козак Ю. А. Научная деятельность ВНИИПП по обеспечению безопасности птицепродуктов // Ветеринария и кормление. 2020. № 2. С. 13–17. DOI: 10.30917/АТТ-VK-1814-9588-2020-2-3.
11. Zhang L., Li L., Pan X., Shi Z., Feng X., Gong B., Li J., Wang L. Enhanced Growth and Activities of the Dominant Functional Microbiota of Chicken Manure Composts in the Presence of Maize Straw // *Frontiers in Microbiology*. 2018. Vol. 9. Pp. 1–11. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01131.
12. Меньшенин И. А. Повысить эффективность утилизации отходов птицеводства – это вполне реально // Птица и птицепродукты. 2019. № 2. С. 34–37. DOI: 10.30975/2073-4999-2019-21-2-34-37.
13. Gorliczay E., Boczonádi I., Kiss N. É., Tóth F. A., Pabar S. A., Biró B., Kovács L. R., Tamás J. Microbiological Effectivity Evaluation of New Poultry Farming Organic Waste Recycling // *Agriculture*. 2021. Vol. 11. Pp. 1–21. DOI: 10.3390/agriculture11070683.
14. Акопян А. Г., Зазыкина Л. А. Обзор рынка биоудобрений животного происхождения // Птицеводство. 2021. № 7–8. С. 60–63. DOI: 10.33845/0033-3239-2021-70-7-8-60-63
15. Петенко А. И., Жолобова И. С., Горковенко Н. Е., Гнеуш А. Н., Антипова Д. В. Микробные ассоциации биогумуса и гуминовых веществ, полученных на основе отходов животноводства // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. 2020. № 157. С. 27–42.
16. Петербургский А. В. Практикум по агрономической химии. Москва: Изд-во Сельхозлитературы, 1963. 592 с.

Об авторах:

Альбина Владимировна Лунева¹, кандидат биологических наук, доцент кафедры паразитологии, ветсанэкспертизы и зоогигиены, ORCID 0000-0002-4863-3590, AuthorID 668708; +7 918 417-21-38, albina.luneva@mail.ru

¹ Кубанский государственный аграрный университет имени И. Т. Трубилина, Краснодар, Россия

Screening of microorganisms which are able to accelerate the process of microbial transformation of bird droppings

A. V. Luneva¹✉

¹ Kuban State Agrarian University named after I. T. Trubilin, Krasnodar, Russia

✉E-mail: albina.luneva@mail.ru

Abstract. The purpose of the research. Screening of collection strains of microorganisms with enzymatic properties to accelerate the processes of microbial biodegradation of bird droppings. Research methods. The proteolytic activity of the grown cultures was studied according to GOST 20264.2-88, the total microbial number in the chicken droppings (CFU/ml) was analyzed, and the ammonium nitrogen was determined. Research results. As a result of the experiments, it was found that the highest proteolytic activity was demonstrated by the strain *Pseudomonas putida* 90 biovar A (171), which amounted to 74.6 units/g. When analyzing the effect of the studied collection strains on the decomposition processes of droppings, it was revealed that the largest number of microbial cells in bird droppings was achieved using *Pseudomonas putida* 90 biovar A (171), which was 104 CFU/ml at the beginning of the researches, and was the maximum and amounted to 1011 CFU/ml by the 15th day. The content of ammonium nitrogen in droppings treated with this culture decreased from 340 mg/l from the beginning of the experiment to 174 (15th day) and 169 mg/l (20th day) and it was the best indicator. When selecting the dose and concentration of the strain-producer *Pseudomonas putida* 90 biovar A (171) under introduction to bird droppings, it was found that to accelerate the process of biodegradation of bird droppings, the optimal dose for applying the studied culture is 4.0 % of organic waste mass with preliminary dilution by 2 times with water. At the same time, the optimal time of droppings keeping and the studied culture is 15 days. Scientific novelty. It was established for the first time that the treatment of chicken manure with the collection strain *Pseudomonas putida* 90 biovar A (171) accelerates the process of its microbial transformation.

Keywords: selection, collection microorganisms, *Pseudomonas*, *Bacillus*, proteolytic activity, chicken droppings, ratio, biodegradation, ammonium nitrogen, total microbial count, processing time, application dose.

For citation: Luneva A. V. Skринing mikroorganizmov, sposobnykh uskoryat' protsess mikrobnoy transformatsii ptich'ego pometa [Screening of microorganisms which are able to accelerate the process of microbial transformation of bird droppings] // Agrarian Bulletin of the Urals. 2021. No. 12 (215). Pp. 50–58. DOI: 10.32417/1997-4868-2021-215-12-50-58. (In Russian.)

Date of paper submission: 26.08.2021, **date of review:** 25.10.2021, **date of acceptance:** 12.11.2021.

References

1. Ulimbashev M. B., Temmoev M. I., Konik N. V., Koshchaev A. G., Luneva A. V., Neverova O. P., Saleeva I. P. A new method of biological disposal of poultry droppings // International Journal of Engineering and Advanced Technology. 2019. Vol. 9. No. 1. Pp. 4953–Lysenko Yu. A., Koshchaev A. G., Luneva A. V., Omarov R. S., Shlykov S. N. Organic meat production of broiler chickens Hubbard Redbro Cross // International Journal of Veterinary Science. 2021. Vol. 10. No. 1. Pp. 25–Shantyz A. Kh., Eganyan E. S., Luneva A. V., Zholobova I. S., Marchenko E. Yu., Lysenko Yu. A. Effektivnost' primeneniya kormovoy dobavki v ratsione tsyplyat-broylerov pri izuchenii ee farmakologicheskikh svoystv [The effectiveness of the use of a feed additive in the diet of broiler chickens in the study of its pharmacological properties] // Scientific Notes Kazan Bauman State Academy of Veterinary Medicine. 2021. T. 245. No. 1. Pp. 218–223 (In Russian.)
2. Fisinin V. I., Buyarov V. S., Buyarov A. V., Shumetov V. G. Myasnoe ptitsevodstvo v regionakh Rossii: sovremennoe sostoyanie i perspektivy innovatsionnogo razvitiya [Meat poultry farming in the regions of Russia: current state and prospects of innovative development] // Agrarian science. 2018. No. 2. Pp. 30–38. (In Russian.)
3. Martynova E. I. ROSPTITsESOUyZ: Itogi 2020 g. podvedeny i novye tseli oboznacheny [ROSPITITSESOYUZ: Results of 2020 summed up and new goals set] // Poultry and Chicken Products. 2021. No. 1. Pp. 6–7. (In Russian.)
4. Fisinin V. I. Mirovye i rossiyskoe ptitsevodstvo: realii i vyzovy budushchego: monografiya [World and Russian poultry farming: realities and challenges of the future: monograph]. Moscow: Khlebproinform, 2019. 470 p. (In Russian.)
5. Martynova E. I., Motina N. V., Bladyko N. A. Itogi vystavki "PRODEKSPO-2021" [Results of the exhibition "PRODEXPO-2021"] // Poultry and Chicken Products. 2021. No. 3. Pp. 5–7. (In Russian.)
6. Royter L. M., Vedenkina N. A., Ereemeeva I. V. Analiticheskie instrumenty v otsenke rynochnogo potentsiala ptitsevodstva [Analytical tools in assessing the market potential of poultry farming] // Poultry and Chicken Products. 2021. No. 4. Pp. 64–68. (In Russian.)
7. Royter L. M., Ereemeeva N. A., Pavlova I. M. Rynochnyy potentsial myasa ptitsy [Market potential of poultry meat] // Ekonomika sel'skogo khozyaystva Rossii. 2020. No. 3. Pp. 69–79. DOI: 10.32651/203-69. (In Russian.)
8. Budrik V. G., Kozak S. S., Kozak Yu. A. Nauchnaya deyatel'nost' VNIIPP po obespecheniyu bezopasnosti ptitseproduktov [Scientific activity of VNIIPP to ensure the safety of poultry products] // Veterinaria i kormlenie. 2020. No. 2. Pp. 13–17. DOI: 10.30917/ATT-VK-1814-9588-2020-2-3. (In Russian.)
9. Zhang L., Li L., Pan X., Shi Z., Feng X., Gong B., Li J., Wang L. Enhanced Growth and Activities of the Dominant Functional Microbiota of Chicken Manure Composts in the Presence of Maize Straw // Frontiers in Microbiology. 2018. Vol. 9. Pp. 1–11. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01131.
10. Men'shenin I. A. Povysit' effektivnost' utilizatsii otkhodov ptitsevodstva – eto vpolne real'no [To increase the efficiency of utilization of poultry waste -Gorliczay E., Boczonádi I., Kiss N. É., Tóth F. A., Pabar S. A., Biró B., Kovács L. R., Tamás J. Microbiological Effectivity Evaluation of New Poultry Farming Organic Waste Recycling // Agriculture. 2021. Vol. 11. Pp. 1–21. DOI: 10.3390/agriculture11070683.
11. Akopyan A. G., Zazykina L. A. Obzor rynka biudobreniy zhitvnogo proiskhozhdeniya [Review of the market for biofertilizers of animal origin] // Ptitsevodstvo. 2021. No. 7–8. Pp. 60–63. DOI: 10.33845/0033-3239-2021-70-7-8-60-63. (In Russian.)
12. Petenko A. I., Zholobova I. S., Gorkovenko N. E., Gneush A. N., Antipova D. V. Mikrobnnye assotsiatsii biogumusa i guminovykh veshchestv, poluchennykh na osnove otkhodov zhitvnovodstva [Microbial associations of biohumus and humic substances obtained from animal waste] // Polythematic online scientific journal of Kuban State Agrarian University. 2020. No. 157. Pp. 27–42. (In Russian.)
13. Peterburgskiy A. V. Praktikum po agronomicheskoy khimii [Workshop on agronomic chemistry]. Moscow: Izdvo Sel'khozliteratury, 1963. 592 p. (In Russian.)

Authors' information:

Albina V. Luneva¹, candidate of biological sciences, associate professor of the department of parasitology, veterinary sanitary expertise and zoohygiene, ORCID 0000-0002-4863-3590, AuthorID 668708; +7 918 417-21-38, albina.luneva@mail.ru

¹ Kuban State Agrarian University named after I. T. Trubilin, Krasnodar, Russia