

УДК 631.879.4 : 579.64

БИОТРАНСФОРМАЦИЯ КУРИНОГО ПОМЁТА СМЕШАННЫМИ КУЛЬТУРАМИ МИКРООРГАНИЗМОВ

К. Г. Семёнова^{1,2}, Ю. Г. Максимова^{1,3}

¹Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия

²Пермский национальный исследовательский политехнический университет, Пермь, Россия

³Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Объектами исследования являлись консорциумы микроорганизмов, осуществляющие биотрансформацию органического вещества куриного помёта. В ходе работы получили смешанные бактериальные культуры из отдельных селекционированных штаммов с определенной ферментативной активностью, изучили влияние комплексов микроорганизмов на изменение элементного состава куриного помёта (ионов аммония, фосфат-ионов). Установили, что обязательным является включение в состав консорциума лактобактерий, микроорганизмов с протеолитической, фосфатмобилизующей и фитатгидролизующей активностью. Данные штаммы способствуют качественному улучшению состава получаемого биоудобрения для растений.

Ключевые слова: переработка отходов птицеводства, смешанные культуры микроорганизмов, компостирование, биопрепараты, органические удобрения.

Введение.

Куриный помёт относится к побочным продуктам животноводства. Содержание органического вещества в нём составляет от 30 до 80%. Отмечается также высокое содержание азота, фосфора, калия, кальция, магния, железа, цинка и других макро- и микроэлементов, что делает куриный помёт ценным органическим удобрением для роста и развития сельскохозяйственных растений. Однако согласно федеральному классификационному каталогу отходов свежий куриный помет относится к 3 классу опасности и не может использоваться без дополнительной обработки [6].

Самым распространенным методом утилизации куриного помёта является складирование [5]. Данный способ требует больших временных затрат, поскольку собственные микробные процессы, происходящие в помёте, неэффективны, что приводит к необходимости выдерживания отхода в помехранилищах в течение 2-3 лет. При этом теряется около 40% азота, что является не желательным процессом [7]. Ввиду большого количества образующихся отходов, метод складирования может повлечь серьезные экологические проблемы – загрязнение почв, водоемов и подземных вод, увеличение зараженности паразитами, патогенными микроорганизмами и насекомыми [4]. Компостирование относится к биологическим способам переработки отходов, является наиболее простым и доступным методом и позволяет в конечном итоге получить ценный продукт в виде органического удобрения [8].

Биотрансформация куриного помёта происходит при участии смешанных популяций микроорганизмов. Применение биопрепаратов на их основе способствует ускорению переработки органических отходов и сокращению продолжительности их складирования до 3-8 недель [6]. В состав известного коммерческого бактериального препарата «Байкал ЭМ-1» входят молочнокислые, фотосинтезирующие, азотфиксирующие бактерии, дрожжевые грибки [9]. Существенным недостатком данного препарата, а также других микробиологических способов переработки является низкая устойчивость микроорганизмов к щелочной среде свежего

куриного помёта. Следовательно, создание новых биопрепаратов на основе эффективных микроорганизмов, является актуальной проблемой современности.

Цель работы заключается в изучении процесса биотрансформации органического вещества куриного помёта под действием различных консорциумов микроорганизмов. В конечном счете, это будет способствовать созданию биопрепарата с наиболее эффективным сочетанием микробных культур.

Новизна работы заключается в использовании экстремофильных микроорганизмов, отличающихся достаточно высокой выживаемостью в чужеродных биотопах: во-первых, при внесении биопрепарата в побочные продукты птицеводства; во-вторых, при внесении их в составе удобрения в почвы для улучшения роста растений.

Материалы и методы.

Для изучения процесса биотрансформации куриного помёта проводили ряд экспериментов с различным сочетанием штаммов микроорганизмов (Л – лактобактерии, 14 КМЦ – целлюлозолитический, ФМ 3.4.2 – фосфатмобилизующий, ФГ 3.9.1 – фитатгидролизующий, 14П – пептонгидролизующий изоляты). Каждый образец помёта перед инокуляцией микробными культурами разводили водой. После внесения бактериальной суспензии подсчитывали число колониеобразующих единиц путём посева десятикратных разведений куриного помёта на питательные среды: ГРМ, Пфеннига с карбоксиметилцеллюлозой (КМЦ) как источником углерода, Сабуро, NBRIP.

Питательная среда NBRIP является селективной для фосфатмобилизующих микроорганизмов и имеет следующий состав (г/л): глюкоза – 10,0; магния хлорид шестиводный – 5,0; магния сульфат семиводный – 0,25; калия хлорид – 2,0; аммония сульфат – 0,1. Трикальций фосфат получают внесением 5,3 г/л шестиводного хлорида кальция, после его растворения добавляют 5,7 г/л двенадцативодного фосфата натрия [11].

Среда Пфеннига для целлюлозолитических микроорганизмов имеет следующий состав (г/л): хлорид аммония — 0,3, дигидрофосфат калия — 0,3, хлорид магния — 0,3, хлорид кальция — 0,03, дрожжевой экстракт — 0,5, раствор микроэлементов по Липперту–Витману — 1 мл. В качестве субстрата вносили до концентрации 1% карбоксиметилцеллюлозу [10].

Выполняли посев в нулевой точке (помёт без инокуляции микроорганизмами), через 7, 14, 28 суток после инокуляции. В каждой точке проводили отбор проб на определение элементов (фосфат-ионы, ионы аммония).

Определение аммиачного азота в курином помёте осуществляли колориметрическим методом. К навеске помёта приливали 0,05 н раствор соляной кислоты, перемешивали на качалке в течение 30 мин, вытяжку отфильтровывали, добавляли 25%-й раствор сегнетовой соли и реактив Несслера. Оптическую плотность растворов определяли через 15 мин на ФЭКе при 440 нм и оценивали концентрацию ионов аммония по калибровочному графику. Концентрацию аммиачного азота выражали в мг NH_4^+ на 1 г помёта [3].

Содержание подвижного фосфора проводили также с помощью колориметрического метода. К навеске помёта добавляли 1%-й раствор углекислого аммония, взбалтывали на качалке в течение 1 часа. После этого вытяжку фильтровали через бумажный фильтр, приливали молибденовый реактив и 1%-й раствор аскорбиновой кислоты в 0,1М соляной кислоте. Оптическую плотность калибровочных и опытных проб измеряли на ФЭКе при длине волны 670 нм. Концентрацию фосфат-ионов выражали в мкг PO_4^{3-} на 1 г помёта [1,2].

Результаты и их обсуждение.

Для опыта №1 по подбору оптимального бактериального сообщества увлажненный куриный помёт инокулировали смесью микроорганизмов: 1 образец: Л+14 КМЦ+ФМ 3.4.2; 2 образец: Л+14П+3К; 3 образец: 14 КМЦ+ФМ 3.4.2. Количественный учёт микроорганизмов проводили путём посева на агаризованные среды (КОЕ/1 г куриного помёта). Динамика КОЕ на среде ГРМ в течение 28 суток представлена на рис. 1. На 28 сутки отмечено снижение количества микроорганизмов во всех образцах при посеве на среды ГРМ, Сабуро и Пфеннига. Это связано

с их частичной гибелью в условиях истощения источников питания и накопления продуктов жизнедеятельности. При высеве нулевой точки на среду NBRIP, селективную для фосфатмобилизаторов, данных микроорганизмов не обнаружено. Селективная среда Пфеннига с КМЦ позволила выявить наличие в исходном образце помёта целлюлозолитических микроорганизмов.

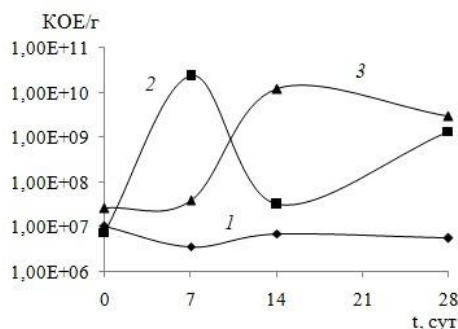


Рисунок 1. Динамика КОЕ в ходе биотрансформации куриного помёта (опыт №1). 1 – образец №1, 2 – образец №2, 3 – образец №3 (на рис.1–6)

Изменение концентрации аммиачного азота представлено на рис. 2. Концентрация ионов аммония во всех образцах практически не менялась по сравнению с нулевой точкой. Это связано с тем, что естественные процессы разложения азотистых оснований органического вещества помёта достигли завершающей стадии.

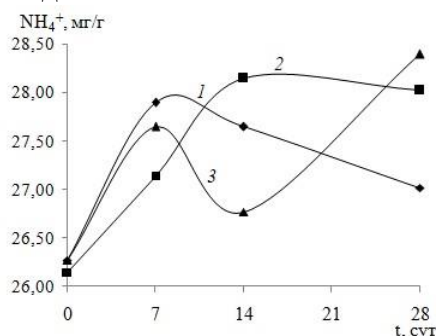


Рисунок 2. Динамика аммиачного азота в ходе биотрансформации куриного помёта (опыт №1)

Результаты определения концентрации подвижного фосфора в динамике отображены на рис. 3. Наблюдали повышение концентрации фосфатов в образце №1, в состав которого входили фосфатмобилизирующие микроорганизмы. Изолят также добавляли к образцу №3, однако подобной динамики увеличения концентрации фосфатов не отмечено. Это связано с отсутствием роста данных микроорганизмов. Образец №2 отличался самыми низкими показателями содержания фосфат-ионов, поскольку фосфатмобилизаторы не были включены в состав консорциума.

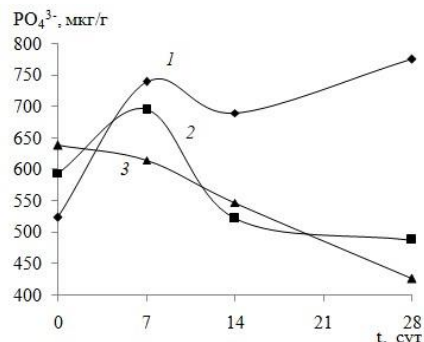


Рисунок 3. Динамика фосфат-ионов в ходе биотрансформации куриного помёта (опыт №1)

Для опыта №2 по подбору оптимального бактериального сообщества увлажненный куриный помёт инокулировали смесью микроорганизмов: 1 образец: Л+14П+ФМ 3.4.2+ФГ 3.9.1; 2 образец: Л+ФМ 3.4.2+ФГ 3.9.1; 3 образец: контроль (помёт без внесения культур микроорганизмов). Данный эксперимент проводили для установления необходимости включения в состав консорциума штамма 14П, а также фитатгидролизующего изолята 3.9.1, способствующего дополнительному высвобождению фосфора из труднодоступных соединений данного элемента.

Динамика изменения КОЕ на среде ГРМ в течение 28 суток представлена на рис. 4. Рост фосфатмобилизующих и фитатгидролизующих микроорганизмов не наблюдался при высеве образца №3 на среду NBRIP. Это связано с тем, что в данном случае помёт не инокулировали смесью микроорганизмов, и образец использовали в качестве контроля. В образце №2 также отсутствовал рост данных микроорганизмов, чего нельзя сказать об образце №1, в который вносили, в том числе и штамм 14П. Полученные результаты позволяют предположить, что данный штамм микроорганизмов способствует выживаемости изолятов ФМ 3.4.2 и ФГ 3.9.1.

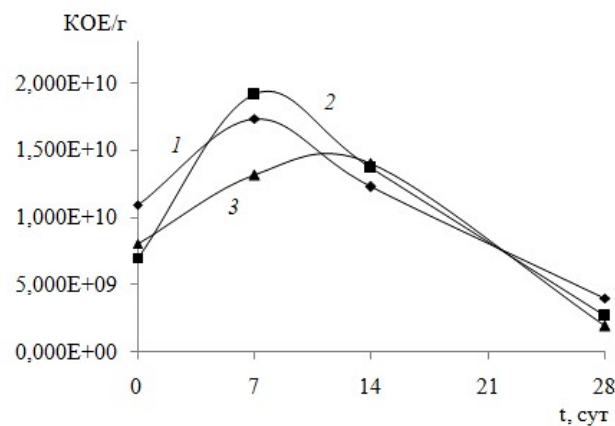


Рисунок 4. Динамика КОЕ в процессе биотрансформации куриного помёта (опыт №2)

Изменение концентрации ионов аммония в течение 28 суток отображено на рис. 5. Наименьшее отклонение от контроля наблюдается в образце №2. В образце №1 прослеживается увеличение концентрации аммиачного азота относительно нулевой точки. Это можно объяснить внесением штамма 14П, обладающего протеолитической активностью и способствующего образованию аммиака.

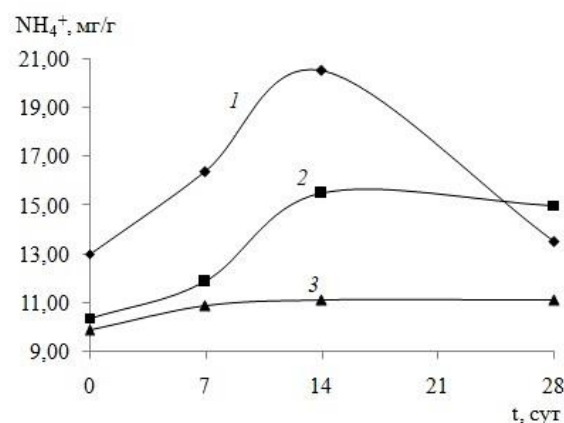


Рисунок 5. Динамика аммиачного азота в ходе биотрансформации куриного помёта (опыт №2)

Динамика концентрации фосфатов в образцах представлена на рис. 6.

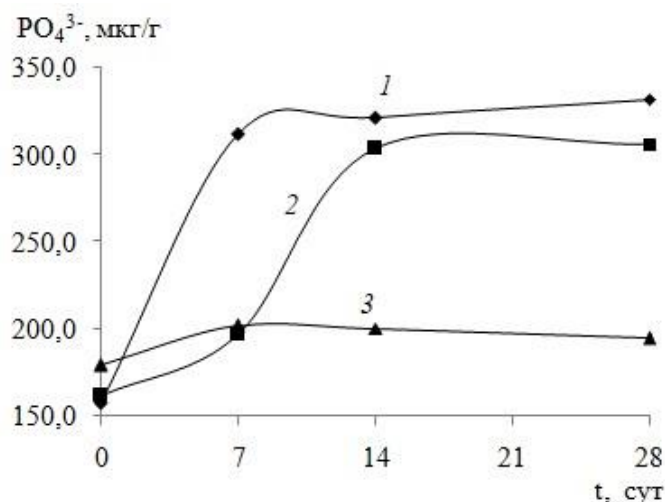


Рисунок 6. Динамика фосфат-ионов в ходе биотрансформации куриного помёта (опыт №2)

В контрольном образце наблюдаются лишь незначительные колебания концентрации свободного неорганического фосфора. Образец №1 характеризуется положительной динамикой концентрации фосфат-ионов, поскольку микроорганизмы, ответственные за увеличение подвижности фосфора, отличаются более высокой выживаемостью в отличие от образца №2.

Заключение. В результате проведения экспериментов по подбору оптимальных бактериальных штаммов пришли к следующим выводам. Так как исходный образец куриного помёта содержал в составе целлюлозолитические микроорганизмы, включение штамма 14КМЦ в состав консорциума не является обязательным.

По наличию роста на селективной для фосфатмобилизирующих микроорганизмов среде судили об их выживаемости в щелочной среде куриного помёта. Рост фосфатмобилизаторов подавлялся в опыте №1 (образец №3) предположительно под воздействием грибов, чего нельзя сказать об образце №1, в который добавляли лактобактерии. Это позволяет предположить наличие у данных микроорганизмов противогрибковой активности, и значит, они имеют перспективу включения в состав биопрепарата. Ввиду отсутствия фосфатмобилизирующих бактерий в исходном образце помёта, а также положительной динамики концентрации подвижного фосфора, образующегося в ходе их жизнедеятельности, добавление изолята ФМ 3.4.2 в консорциум является обязательным.

В опыте №2 (образец №1) отмечается повышение концентрации аммиачного азота, что говорит о более интенсивном процессе разложения белков благодаря пептонгидролизующему штамму 14П. Также можно предположить, что данный штамм способствует выживаемости фосфатмобилизаторов в помёте, следовательно, его необходимо включить в состав консорциума.

Концентрация фосфат-ионов в опыте №1 (образец №1) через 28 суток биотрансформации куриного помёта увеличилась на 47,9% по сравнению с нулевой точкой. Внесение же в образец №1 (опыт №2) фитатгидролизующих микроорганизмов привело к повышению концентрации свободного фосфора на 111,5%. Таким образом, добавление изолята ФГ 3.9.1 является перспективным для увеличения растворимости труднодоступных соединений фосфора.

Благодарности. Исследование выполнено при поддержке гранта № 19112ГУ/2023 в рамках программы фонда содействия инновациям УМНИК.

Библиографический список

1. ГОСТ 18309-2014. Вода. Методы определения фосфорсодержащих веществ: дата введения 2016-01-01. М.: Стандартинформ, 2019. 23 с.
2. ГОСТ 26205-91. Почвы. Определение подвижных соединений фосфора и калия по методу Мачигина в модификации ЦИНАО: дата введения 1993-07-01. М.: Комитет стандартизации и метрологии СССР, 1992. 10 с.
3. Леймоева А. Ю. Практикум по агрохимии: Методические указания для лабораторных занятий по агрохимии для студентов по направлению подготовки Агрономия: Министерство науки и высшего образования РФ ФГБОУ ВО «Ингушский Государственный Университет». 2020. 53 с.
4. Маринченко Т.Е. Перспективные разработки в области переработки помета // Эффективное животноводство: электронный журнал. 2021. С. 80-83.
5. Пискаева А.И. Анализ способов переработки сельскохозяйственных органических отходов на примере куриного помета // Аэкономика: экономика и сельское хозяйство: электронный журнал. 2016. С. 1-8.
6. Попов В.Н., Корнеева О.С., Искусных А.Ю. Инновационные способы переработки биоотходов птицеводства // Вестник ВГУИТ. 2020. Т. 2, № 1. С. 194-200.
7. Романов А.С., Васильев Э.В. Анализ интенсивных технологий переработки побочных продуктов животноводства с внедрением альтернативных источников энергии // Техника и технологии в животноводстве. 2022. № 48. С. 90-97.
8. Семенов М.В., Железова А.Д., Ксенофонтова Н.А. Куриный помет как органическое удобрение: технологии компостирования и влияние на почвенные свойства // Бюллетень Почвенного института имени В.В. Докучаева. 2023. № 115. С. 160-198.
9. Суховеркова, В. Е. Способы утилизации птичьего помета, представленные в современных патентах // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. 2016. № 9. С. 45-55.
10. Шилова А. В., Максимов А. Ю., Максимова Ю. Г. Изменения микробиома как индикатор восстановления природных сред содового шламохранилища АО «Березниковский содовый завод» // Вода и экология: проблемы и решения. 2020. №1 (81).
11. Nadeem M, Wu J, Ghaffari H, Kedir AJ, Saleem S, Mollier A, Singh J, Cheema M. Understanding the Adaptive Mechanisms of Plants to Enhance Phosphorus Use Efficiency on Podzolic Soils in Boreal Agroecosystems. 2022, P. 1-23.