

СТАТЬИ

УДК 579.22

ОТБОР ШТАММОВ, ПЕРСПЕКТИВНЫХ ДЛЯ ПЕРЕРАБОТКИ ОСАДКОВ СТОЧНЫХ ВОД

¹Аюпова А.Ж., ¹Хасенова Э.Ж., ^{1,2}Сарсенова А.С., ¹Молдагулова Н.Б.,
²Уланкызы А., ¹Кусайын А.Б., ²Тунгышпаева З.Б., ¹Курманбаев А.А.

¹ТОО «Экостандарт.kz», Нур-Султан, e-mail: a.ibraeva@mail.ru;

²ТОО «Научно-производственный центр экологической и промышленной биотехнологии»,
Нур-Султан

Из иловых осадков сточных вод канализационно-очистных сооружений (г. Нур-Султан, Рудный, Форт-Шевченко), почвы и свежескошенной травы, отобранной на дачном участке (г. Нур-Султан), выделено 60 культур микроорганизмов. Для отбора активных штаммов, способных перерабатывать осадки сточных вод, все микроорганизмы, выделенные в чистую культуру, были протестированы на ферментативную активность – липолитическую, протеолитическую, целлюлолитическую, амилолитическую. По результатам исследований отобрано 15 изолятов с разными фенотипическими признаками, обладающих наиболее высокой ферментативной активностью. Изучены культурально-морфологические свойства отобранных изолятов, способность к спорообразованию и к росту при различных температурах. Из отобранных культур 3 изолята способны к росту при температуре выше 45 °С. Для остальных культур оптимальным для роста является диапазон температур 28–37 °С. Идентификация отобранных микроорганизмов выявила принадлежность выбранных штаммов к роду *Rhodococcus rhodochrous*, *Cryseobacterium arachidis*, *Pseudoxanthomonas sp.*, *Bacillus megaterium*, *Pediococcus acidilactici*, *Paenibacillus residui*, *Brevibacillus invocatus*, *Bacillus licheniformis*, 2 штамма отнесены к *Bacillus cereus*, 3 к *Enterobacter cloacae* и 2 к *Ochrobactrum intermedium*. Отобранные штаммы микроорганизмов с наибольшей ферментативной активностью могут стать претендентами на создание на их основе эффективного биопрепарата для переработки иловых осадков сточных вод канализационно-очистных сооружений городов.

Ключевые слова: микроорганизмы, ферментативная активность, иловые осадки, компостирование, канализационно-очистные сооружения

SELECTION OF STRAINS PROMISING FOR THE PROCESSING OF SEWAGE SLUDGE

¹Ayupova A.Zh., ¹Khasenova E.Zh., ^{1,2}Sarsenova A.S., ¹Moldagulova N.B.,
²Ulankeyzy A., ¹Kusayyn A.B., ²Tungyshpaeva Z.B., ¹Kurmanbaev A.A.

¹Ecostandart.kz LLP, Nur-Sultan, e-mail: a.ibraeva@mail.ru;

²LLP «Scientific and Production Center of Ecological and Industrial Biotechnology», Nur-Sultan

60 cultures of microorganisms were isolated from sludge from sewage treatment plants (cities Nur-Sultan, Rudny, Fort Shevchenko), soil, and freshly cut grass selected from the suburban area of Nur-Sultan. All microorganisms isolated in pure culture were tested for enzymatic activity – lipolytic, proteolytic, cellulolytic, and amylolytic in order to select the active strains of bacteria capable of sewage sludge processing. According to the results of the studies, 15 isolates with different phenotypic characteristics with the highest enzymatic activity were selected. The cultural and morphological properties of the selected isolates were studied. The spore-forming ability and optimal temperature growth of selected bacteria were determined. According to the results, three isolates grew at temperatures above 45 °C. The optimal growth temperature for other cultures was 28–37 °C. Identification of the selected microorganisms revealed that strains belong to the following genus: *Rhodococcus rhodochrous*, *Cryseobacterium arachidis*, *Pseudoxanthomonas sp.*, *Bacillus megaterium*, *Pediococcus acidilactici*, *Paenibacillus residui*, *Brevibacillus invocatus*, *Bacillus licheniformis*, two *Bacillus cereus*, *Enterobacter cloacae*, *Ochrobactrum intermedium*. The selected strains of microorganisms with the highest enzymatic activity can become candidates for biological preparation development for the processing of sewage sludge plants in cities.

Keywords: microorganisms, enzymatic activity, sludge sediments, composting, sewage treatment plants

Огромные количества осадков сточных вод, накапливающиеся в городах и промышленных центрах, представляют серьезную экологическую проблему [1]. Чтобы справиться со всем объемом образующихся отходов, нужна промышленная безотходная, экологически чистая технология. Анализ современного состояния почвенного покрова Республики Казахстан, в том числе его плодородия, показал, что в результате экстенсивного использования земельных ресурсов произошли существенные измене-

ния в сторону снижения содержания гумуса в почве и интенсивной деградации и опустынивания земель [2].

Однако несомненным достоинством осадков сточных вод является высокое содержание в них органического вещества, которое может варьировать в пределах 40–75%, и широкий набор микроэлементов [3]. В связи с чем использование осадков сточных вод в земледелии рассматривается как одно из перспективных направлений их утилизации [1].

С использованием технологии биологического компостирования возможна безопасная и экологически чистая переработка осадка сточных вод в органическое удобрение. Ключевым фактором успешного компостирования является выбор штамма при приготовлении эффективных комплексных микробных препаратов [4]. Широкий спектр микроорганизмов способен расщеплять и окислять макромолекулы. Ведущую роль в превращении органических веществ играют гидролитические ферменты [5]. При компостировании микроорганизмы используют как внеклеточные, так и внутриклеточные ферменты для гидролиза органических веществ и превращения сложных соединений в простые молекулы которые могут быть ассимилированы и, наконец, минерализованы [6]. Поиск новых штаммов, которые позволили бы сократить продолжительность биологической переработки отходов и в то же время обеспечить получение полноценного конечного продукта (например, компоста) или отходов, отвечающих требованиям законодательства (например, стабилизированных отходов), в настоящее время является одной из актуальных задач.

Целью данной работы является изучение, выделение и отбор штаммов, перспективных для переработки осадков сточных вод.

Материалы и методы исследования

Выделение чистых культур микроорганизмов проводили поэтапно: получение накопительной культуры; выделение чистой культуры; определение чистоты и определение ферментативной (протеолитической, липолитической, амилазной и уреазной, целлюлолитической) активности [7].

Штаммы бактерий идентифицировали методом MALDI-TOF масс-спектрометрией при идентификации микроорганизмов на масс-спектрометре Microflex LT («Bruker Daltonics», Германия). Использовалась коммерческая база данных (MALDI Biotyper 4.0, Bruker Daltonics) согласно инструкции производителя.

Результаты исследования и их обсуждение

Производство осадка сточных вод в Казахстане составляет около 5 млн т в год, и этот объем постоянно увеличивается с увеличением населения страны. Поскольку осадок сточных вод может содержать вредные компоненты, такие как патогенные организмы, органические соединения, избыток фосфора и азота, неправильное обращение с ним может иметь много неблагоприятных последствий для окружающей среды. Одним из методов биоконверсии органических отходов в экологически чистое удобрение является компостирование. В ускорении процесса компостирования органических отходов существенную роль играют микроорганизмы, продуцирующие гидролитические ферменты (амилаза, протеаза, целлюлаза, липаза, уреаза), ответственные за разложение органических соединений [8]. В статье представлены данные по характеристике ферментативного потенциала бактерий, выделенных из осадка сточных вод канализационно-очистных сооружений г. Нур-Султан, Рудный, Форт-Шевченко, дачной почвы и свежескошенной травы с дачного участка (г. Нур-Султан), для переработки органических отходов и выявления активных штаммов.

Выделение микроорганизмов проводили методом накопительных культур на жидких питательных средах с последующим высевом на плотные среды для изолирования отдельных колоний (рис. 1).

Чистые культуры аэробных микроорганизмов пересеивали на плотные питательные среды: СПА, МРС-4, трехсахарный агар, Гетчинсона, Macconkey, Hottinger, Pseudomonas методом истощающего штриха по Гоулду. Чистоту выделенных культур микроорганизмов оценивали микроскопическим контролем по Граму. В результате проведенных экспериментов выделено 60 микроорганизмов (рис. 2), из которых 3 были термофильными (DS1, DS2 и DS3).



Рис. 1. Накопительная культура

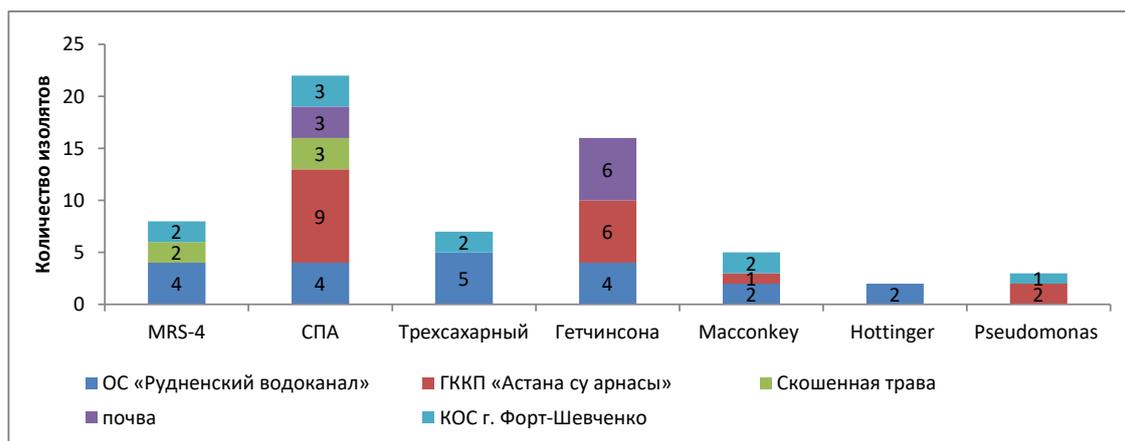


Рис. 2. Количество изолятов, выделенных из разных источников

Наибольшее количество изолятов выделено из иловых осадков и сточных вод г. Рудный ОС «Рудненский водоканал» и г. Нур-Султана ГККП «Астана су арнасы», 21 и 18 культур соответственно. Из сточных вод КОС г. Форт-Шевченко выделено 7 изолятов. Наименьшее количество изолятов отобрано из дачной почвы г. Нур-Султана и свежескошенной травы – 9 и 5 соответственно.

Для выбора перспективных микроорганизмов для переработки ОСВ выделенные штаммы бактерий были протестированы

на ферментативные свойства (табл. 1) – липолитическую, протеолитическую, амилолитическую, целлюлолитическую, уреолитическую и нефтеокисляющую активность.

По результатам экспериментов гидролиз крахмала (амилолитическая активность) обнаружен у 2 изолятов – СВ2/2, СВ2/1, по наибольшей способности расщеплять казеин отобраны 3 культуры – СВ2, СВ2/1, СВ1/1. Из 60 культур максимальной способностью расщеплять жиры обладали 3 культуры – СВ3, СВГ1/1, ИЛ3. Данные изоляты были отобраны для дальнейшей работы.

Таблица 1

Ферментативная активность изолятов

Изолят	Ферментативная активность (d, mm)					
	Амилаза	Протеаза	Липаза	Целлюлаза	Уреаза	Углеводород окисляющая
1	2	3	4	5	6	7
СВ2	0	11,9±0,17	0	0	+	–
СВ3	0	0	14,23±0,25	0	–	+
СВ1/1	5,93±0,12	12,03±0,45	0	0	–	–
СВ2/2	11,93±0,12	7,00±0,20	0	5,73±0,25	+	–
СВГ1/1	0	0	12,97±0,25	0	–	–
СВ2/1	8,03±0,25	10,03±0,25	0	0	+	–
ДС1	0	0	0	16,10±0,17	–	–
ДС2	0	0	0	17,97±0,06	–	–
ДС3	0	0	0	5,93±0,12	–	–
ИЛ3	0	0	12,27±0,25	20,60±0,53	+	–
ИЛ5	0	4,07±0,31	0	18,07±0,12	–	–
П1	0	8,13±0,15	0	7,93±0,21	–	–
П2	0	0	0	16,03±0,06	–	–
П5	0	0	0	20,33±0,58	+	–
П3	0	0	0	19,93±0,40	+	–

В результате скрининга отобраны 7 штаммов активных, обладающих целлюлозолитической активностью (DS1, DS2, ИЛ3, ИЛ5, П2, П5, П3).

Способностью к быстрому разложению мочевины обладали 6 культур. Изолят П1 отобран по средней способности расщеплять казеин и целлюлозу. Изолят DS3 является термофильным и облада-

ет целлюлозолитической активностью, поэтому также отобран для дальнейших исследований.

Таким образом, на основе проведенных исследований было отобрано 15 изолятов – СВ2, СВ3, СВ1/1, СВ2/2, СВГ1/1, СВ2/1, DS1, DS2, DS3, ИЛ3, ИЛ5, П1, П2, П5, П3.

В табл. 2 и 3 представлены культуральные свойства отобранных микроорганизмов.

Таблица 2

Макро- и микроскопия отобранных изолятов

Изоляты	Колонии	Микроскопия	Изоляты	Колонии	Микроскопия
СВ 1/1			СВ 2/2		
СВ 2/1			СВГ1/1		
СВ2			СВ 3		
DS 1			DS 2		
DS 3			Ил 3		
Ил 5			П-1		
П-3			П-5		
П-2					

Таблица 3

Культуральные свойства изолятов

№	Изолят	Размер, мм	Форма	Поверхн.	Профиль	Край	Цвет	Текстура (консистенция)
1	CB 2	2,5–3	круглая	гладкая	плоский	неровный	серо-бежевый	мягкая
2	CB 3	1,5–2	круглая	гладкая	выпуклый	ровный	оранжевый	мягкая
3	CB 1/1	3–5	круглая	матовая	плоский	неровный	светло-бежевый	однородная
4	CB 2/2	1–3	неправильная	глянцевая	выпуклый	неровный	желтый	однородная
5	CBГ 1/1	1–1,5	круглая	гладкая	плоский	ровный	светло-оранжевый	мягкая
6	CB 2/1	3–5	круглая	глянцевая	выпуклый	неровный	молочный	однородная
7	DS1	0,2	круглая	глянцевая	выпуклый	ровный	белые	однородная, мягкая
8	DS2	3–4	неправильная	блестящая	выпуклый	неровные	бежевые	слизистая
9	DS3	3-5	неправильная	глянцевая	выпуклый	неровный	белые	неоднородная, слизистая
10	ИЛ3	0,5-1	круглая	глянцевая	выпуклый	ровный	белые	однородная, мягкая
11	ИЛ5	0,5-1	круглая	глянцевая	выпуклый	ровный	бежевый	однородная
12	П1	3- 5	круглая	матовая	выпуклый	неровный	бежевый	прозрачная, мягкая
13	П2	0,5-1	круглая	глянцевая	плоский	ровные	бежевые	однородная, мягкая
14	П5	0,5-1	круглая	глянцевая	плоский	ровные	бежеый	однородная, мягкая
15	П3	0,5-3	круглая	глянцевая	плоский	ровные	белые	однородная, мягкая

Таблица 4

Идентификация штаммов по Maldi-TOF

Штамм	Maldi-TOF	
	Микроорганизм (наибольшее соответствие)	Диапазон идентификации
CB 2	<i>Bacillus cereus</i>	1,732
CB 3	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	2,072
CB 1/1	<i>Bacillus cereus</i>	2,3
CB 2/2	<i>Cryseobacterium arachidis</i>	1,849
CBГ 1/1	<i>Pseudoxanthomonas sp.</i>	2,14
CB 2/1	<i>Bacillus megaterium</i>	2,108
DS1	<i>Pediococcus acidilactici</i>	2,181
DS2	<i>Paenibacillus residui</i>	2,238
DS3	<i>Brevibacillus invocatus</i>	1,838
ИЛ3	<i>Enterobacter cloacae</i>	2,126
ИЛ5	<i>Ochrobactrum intermedium</i>	2,101
П1	<i>Bacillus licheniformis</i>	1,932
П2	<i>Ochrobactrum intermedium</i>	1,852
П5	<i>Enterobacter cloacae</i>	2,007
П3	<i>Enterobacter cloacae</i>	2,048

Примечание: диапазон идентификации: 2,300–3,000 и более – высокая степень идентификации, 2,000–2,299 – вероятная идентификация вида, 1,700–1,999 – вероятная идентификация рода, 0,000–1,699 – идентификация невозможна

Большая часть отобранных изолятов грамположительные, 4 изолята – грамтрицательные. СВГ1/1 и DS1 имели кокообразную форму клеток, все остальные изоляты имели палочковидную форму клеток. Рост всех изолятов на плотных питательных средах отличается по размеру, форме колоний, цвету, текстуре, профилю, поверхности и краю колоний.

Спорообразование наблюдалось у 6 изолятов: СВ1/1, СВ2, СВ2/1, DS2, DS3, П1. Из отобранных культур 3 изолята способны к росту при температуре выше 45 °С, при 28 °С рост клеток останавливался. Для остальных культур оптимальным для роста является диапазон температур 28–37 °С.

Идентификация (табл. 4) отобранных микроорганизмов на масс-спектрометре (Maldi-TOF) выявила принадлежность выбранных штаммов к роду *Rhodococcus rhodochrous* – СВ3, 2 штамма – СВ2, СВ1/1 – *Bacillus cereus*, СВ 2/2 – *Cryseobacterium arachidis*, СВГ 1/1 – *Pseudoxanthomonas* sp., СВ2/1 – *Bacillus megaterium*, DS1 – *Pediococcus acidilactici*, DS2 – *Paenibacillus residui*, DS3 – *Brevibacillus invocatus*, 3 штамма ИЛ3, П5, П3 – *Enterobacter cloacae*, 2 штамма ИЛ5, П2 – *Ochrobactrum intermedium*, П1 – *Bacillus licheniformis*.

Среди отобранных бактерий рода *Bacillus* представлен видами *Bacillus cereus*, *B. megaterium*, *B. licheniformis*. Члены этого рода образуют эндоспоры, устойчивые к высоким температурам, коррозии и пагубным параметрам окружающей среды, они могут расти и размножаться даже при 80 °С и являются важными микроорганизмами в процессе компостирования [9].

Практически все представители отобранных видов микроорганизмов известны как активные разрушители органических веществ. Данные бактерии являются перспективными для дальнейшей переработки осадков сточных вод в органическое удобрение.

Заключение

Таким образом, из сточных вод КОС г. Нур-Султан, Рудный, Форт-Шевченко, дачной почвы и свежескошенной травы с дачного участка (г. Нур-Султан) выделено 60 изолятов. В процессе скрининга было отобрано 15 активных изолятов, установлена их видовая принадлежность. Отобранные штаммы будут использованы при создании эффективного биопрепарата для компостирования иловых осадков сточных вод.

Список литературы

1. Куликова А.Х., Захаров Н.Г., Вандышев И.А., Шайкин С.В. Проблема утилизации осадков сточных вод (ОСВ) в качестве удобрения сельскохозяйственных культур // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. 2007. № 1 (4). С. 8–18.
2. Сапаров А.С., Елешев Р.Е., Сулейменов Б.У. Современные проблемы почвенно-агрохимической науки Казахстана и пути их решения // Казахский НИИ почвоведения и агрохимии. Новости НАН РК, серия аграрных наук. Алматы. 2016. № 1. С. 91–101.
3. Орлов Д.С., Садовникова Л.И. Нетрадиционные мелиорирующие средства и органические удобрения // Почвоведение. 1996. № 4. С. 517–523.
4. Agyeman F.O., Tao W. Anaerobic co-digestion of food waste and dairy manure: effects of food waste particle size and organic loading rate. *J Environ Manage.* 2014. № 133. P. 268–274.
5. He Y., Xie K., Xu P., Huang X., Gu W., Zhang F., Tang S. Evolution of microbial community diversity and enzymatic activity during composting. *Res. Microbiol.* 2013. № 164. P. 189–198.
6. Robledo-Mahón T., Calvo C., Aranda E. Enzymatic Potential of Bacteria and Fungi Isolates from the Sewage Sludge Composting Process Tatiana. *Appl. Sci.* 2020. № 10. P. 7763. DOI:10.3390/app10217763.
7. Руководство к практическим занятиям по микробиологии / Под ред. Н.С. Егорова. М.: Московский университет, 1995. 220 с.
8. Moldagulova N., Ayupova A., Sembayeva D., Duambekov M., Khassenova E., Nagyzbekkyzy E., Danlybayeva G., Sarsenova A. Data on the isolation and identification of thermotolerant microorganisms from cow manure promising for organic waste processing, *Data in Brief.* 2020. № 31.
9. Zhao K., Xu R., Zhang Y., Tang H., Zhou Ch., Cao A., Zhao G., Guo H. Development of a novel compound microbial agent for degradation of kitchen waste. *Brazilian Journal of Microbiology.* 2017. Vol. 48. Issue 3. P. 442–450.