

УДК 579.24

**ВЫДЕЛЕНИЕ ГИДРОЛИЗНЫХ БАКТЕРИЙ  
ИЗ БИОГАЗОВОЙ УСТАНОВКИ, РАБОТАЮЩЕЙ  
НА НАВОЗЕ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА,  
И ИЗУЧЕНИЕ ИХ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ**

<sup>1,2</sup>Молдагулова А.К., <sup>1</sup>Ануарбекова С.С., <sup>1,2</sup>Молдагулова Н.Б.,

<sup>1</sup>Кульмагамбетова Р.Х., <sup>1,2</sup>Сарсенова А.С., <sup>1</sup>Курманбаев А.А.

<sup>1</sup>ТОО «Экостандарт.kz», Нур-Султан, e-mail: asel7777@mail.ru;

<sup>2</sup>ТОО «Научно-производственный центр экологической и промышленной биотехнологии», Нур-Султан

В данной работе представлены результаты выделения и скрининга гидролизных микроорганизмов для получения биогаза. В основе эффективного производства биогаза лежит сложный микробиологический процесс, первой стадией которого является гидролиз органических веществ. Из лабораторной однокамерной биогазовой установки (БУ) с рабочим объемом 10 л, в качестве субстрата использующей навоз КРС, и коровьего навоза путем посева на различные селективные питательные среды (СПА, МПА, Сабуро, МРС) было выделено 18 чистых изолятов. Изучены культурально-морфологические признаки и жизнеспособность выделенных микроорганизмов. Далее проведен скрининг микроорганизмов по их гидролизной активности: амилотическая, протеолитическая, целлюлолитическая, уреазная, липазная. Максимальный показатель ЖСП варьировал в пределах  $10^6$ – $10^8$  КОЕ/мл. Изучение ферментативной активности полученных изолятов, а именно активности гидролаз, показало, что 12 выделенных культур обладают протеолитической активностью. Амилотической активностью обладали только 2 изолята, наибольшей целлюлолитической активностью обладали 11 изолятов. Способностью разложения мочевины до аммиака обладали 4 изолята. Липолитическую активность проявили 3 изолята. В результате проведения генетической идентификации отобранных изолятов по MALDI-TOF выделенные микроорганизмы отнесены к *Ochrobactrum tritici*, *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas citronellolis*, *Lysinibacillus sphaericus*, *Acinetobacter johnsonii*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*.

**Ключевые слова:** навоз КРС, микроорганизмы, биогазовая установка, ферментативная активность

**ISOLATION OF HYDROLYSIS BACTERIA  
FROM A BIOGASEQUIPMENT WORKING ON CATTLE MANURE  
AND STUDIIND OF THEIR ENZYMATIC ACTIVITY**

<sup>1,2</sup>Moldagulova A.K., <sup>1</sup>Anuarbekova S.S., <sup>1,2</sup>Moldagulova N.B.,

<sup>1</sup>Kulmagambetova R.Kh., <sup>2</sup>Sarsenova A.S., <sup>1</sup>Kurmanbaev A.A.

<sup>1</sup>Ecostandart.kz LLP, Nur-Sultan, e-mail: asel7777@mail.ru;

<sup>2</sup>LLP «Scientific and Production Center of ecological and industrial biotechnology, Nur-Sultan

This paper presents the results of isolation and screening of hydrolytic microorganisms for biogas production. Efficient biogas production is based on a complex microbiological process, the first stage of which is the hydrolysis of organic substances. From a laboratory single-chamber BU with a working volume of 10 l, using cattle manure as a substrate, and cow manure by inoculation on various elective nutrient media (SPA, MPA, Saburo, MRS), 18 pure isolates were isolated. The cultural and morphological features and viability of isolated microorganisms were studied. Next, screening of microorganisms was carried out according to their hydrolytic activity: amylolytic, proteolytic, cellulolytic, urease, lipase. The maximum GSP index varied within 106-108 CFU/ml. The study of the enzymatic activity of the obtained isolates, namely the activity of hydrolases, showed that 12 isolated cultures have proteolytic activity. Only 2 isolates had amylolytic activity, 11 isolates had the highest cellulolytic activity. 4 isolates had the ability to decompose urea to ammonia. 3 isolates showed lipolytic activity. As a result of the genetic identification of the selected isolates by MALDI-TOF, the isolated microorganisms were assigned to *Ochrobactrum tritici*, *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas citronellolis*, *Lysinibacillus sphaericus*, *Acinetobacter johnsonii*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*.

**Keywords:** cattle manure, microorganisms, biogas plant, enzymatic activity

Животноводческие отходы являются источником загрязнения воздуха и водных ресурсов. Однако при правильном управлении данным видом отходов они могут служить энергетическим ресурсом [1].

Путем анаэробного сбраживания из животноводческих отходов получают биогаз. Использование навоза для получения биогаза имеет ряд достоинств, например производство энергии без ископаемого топлива, повторное использование питательных ве-

ществ и сокращение выбросов парниковых газов в сельском хозяйстве [2]. Потенциал производства биогаза из животноводческих отходов в Казахстане в целом высок, поэтому существует необходимость развития данной отрасли.

Животноводческие отходы имеют высокое содержание воды и клетчатки, что приводит к малым выработкам биогаза и эффективности разложения, что в свою очередь препятствует более широкому ис-

пользованию биогазовой технологии в сельском хозяйстве [3]. Более того, патогенные микроорганизмы, которые могут встречаться в составе навоза, являются барьером для использования переработанного навоза в качестве удобрения [4]. Добавление специально подобранных микроорганизмов в животноводческие отходы позволит увеличить выход биогаза и снизить количество патогенных микроорганизмов.

В первой фазе анаэробного брожения активизируются гидролизные микроорганизмы. В этой фазе сложные органические вещества распадаются на простые водорастворимые соединения, которые могут поглощаться микробными клетками. Сложные макромолекулы, такие как углеводы, белки и жиры соответственно, превращаются в моносахариды, аминокислоты и жирные кислоты. Это происходит за счет ферментативного гидролиза, в котором различные факультативные и/или облигатные анаэробные гидролитические бактерии выделяют экзоферменты, которые способствуют расщеплению ковалентных связей в субстрате в результате химической реакции с водой. Ферменты, участвующие в процессе гидролиза, называют гидролазами. Разные гидролазы синтезируются специфичными видами гидролитических бактерий для деградации различных макромолекул. Например, целлюлолитические бактерии синтезируют целлюлазу для гидролиза целлюлозы, в то время как липолитические бактерии синтезируют липазы для гидролиза жировых молекул. Гидролиз неструктурных углеводов происходит быстро, порядка нескольких часов, в то время как гидролиз белков и жиров может продолжаться до нескольких дней [5].

Гидролизные микроорганизмы играют очень важную роль в процессе получения биометана. Целью нашей работы явилось выделение и изучение гидролизных бактерий из субстрата биогазовой установки (БУ), работающей на навозе крупного рогатого скота (КРС), и навоза КРС.

#### Материалы и методы исследования

Изоляты микроорганизмов выделяли из субстрата БУ (навоза) с использованием общепринятого в бактериологической практике метода, который проходит в три этапа: получение накопительной культуры; выделение чистой культуры; определение чистоты выделенной культуры [6].

Для выделения мезофильных бактерий инкубацию субстрата БУ производили при 37 °С в течение 24 ч. Для выделения термофильных бактерий инкубацию субстрата производили при 45 °С – 24 ч.

Для получения изолятов микроорганизмов выросшие колонии пересеивали методом ищущающего штриха по Голду.

Чистота выделенной культуры микроорганизмов тщательно проверялась. При визуальном контроле просматривался рост микроорганизмов по штриху на поверхности скошенной среды.

Оценку максимального показателя жизнеспособности (ЖСП) проводили методом Miles&Misra [7] с целью получения жизнеспособных культур с показателем  $10^6$ – $10^7$  КОЕ/мл и более.

Скрининг выделенных изолятов проводили на основе изучения ферментативной активности путем определения амилолитической, протеолитической, целлюлолитической, липазной и уреазной активностей.

Проведена идентификация микроорганизмов с использованием MALDI-TOF масс-спектрометра Microflex («Bruker-Daltonics», Германия). Полученные белковые спектры сравнивали с эталонными спектрами, имеющимися в базе данных BrukerDatabaseVersion 3.3.1.0, используя программное обеспечение Biotyper [8].

#### Результаты исследования и их обсуждение

Из лабораторной однокамерной БУ с рабочим объемом 10 л, в качестве субстрата использующей навоз КРС, и коровьего навоза путем посева на различные селективные питательные среды (СПА, МПА, Сабуро, МРС) было выделено 18 чистых изолятов. Из них один изолят был способен расти при температуре 45 °С, а остальные при 37 °С. Все выделенные объекты, по культурально-морфологическим признакам отнесены к бактериальным культурам.

Рост всех изолятов на плотных питательных средах отличался по форме колоний, цвету, текстуре, профилю, поверхности и краям колонии (табл. 1).

На рис. 1, а, представлена колония изолята В3: колония кремового цвета, поверхность матовая, края неровные; на рис. 1, б – изолят В6: колония бежевого цвета, поверхность гладкая, блестящая с неровными краями.

С помощью микроскопии окрашенных по Граму мазков было определено, что в исследуемых образцах присутствуют грамположительные микроорганизмы в форме палочек с закругленными концами, разных размеров, образующих или не образующих спор, расположенные одиночно, парно, в цепочку или скоплениями. На рис. 2 представлена микроскопия некоторых выделенных чистых изолятов. Изоляты чистые, однородные.

Таблица 1

Культурально-морфологические свойства изолятов

№	Изолят	Размер, мм	Форма	Поверхность	Край	Цвет	Рост в жидкой среде	ЖСП
1	№ 846	2–3	НП	М	Р	Б	МНБО	10 <sup>7</sup>
2	№ 847	3–5	К	Г	Р	Б	МНБО	10 <sup>8</sup>
3	№ 848	1–3	НП	Г	Н	Б	МНПП	10 <sup>8</sup>
4	№ 849	1–3	К	Г	Н	Б	МНБО	10 <sup>8</sup>
5	№ 850	1–3	НП	Г	Н	С	МНПП	10 <sup>8</sup>
6	№ 851	2–5	К	М	Р	С	МО	10 <sup>7</sup>
7	№ 852	2–4	К	Г	Р	Б	МНПП	10 <sup>8</sup>
8	№ 853	2–5	К	Г	Р	Б	МНПП	10 <sup>8</sup>
9	№ 854	1–3	К	М	Н	Б	МО	10 <sup>8</sup>
10	№ 855	1–3	К	Г	Н	С	МО	10 <sup>8</sup>
11	№ 856	2–4	К	Г	Р	Б	МО	10 <sup>7</sup>
12	№ 857	2–5	К	Г	Р	Б	МО	10 <sup>7</sup>
13	№ 858	2–3	К	Г	Н	Б	МО	10 <sup>8</sup>
14	В3	2–4	К	М	Н	Б	МО	10 <sup>6</sup>
15	В4	2–3	К	Г	Н	К	МО	10 <sup>6</sup>
16	В5	2,5–3	К	Г	Н	К	МО	10 <sup>6</sup>
17	В6	2–3	НП	М	Н	Б	МНПП	10 <sup>6</sup>
18	В7	2–5	НП	М	Н	Б	МНПП	10 <sup>6</sup>

Примечание. К – круглая, НП – неправильная, Г – глянцевая, М – матовая, Р – ровная, Н – неровная, Б – беловатая, С – серая, МО – мутность, осадок, МНБО – мутность, небольшой осадок, МНПП – мутность, на поверхности пленка



Рис. 1. Рост колоний изолятов В3 (а) и В6 (б) на питательной среде СПА

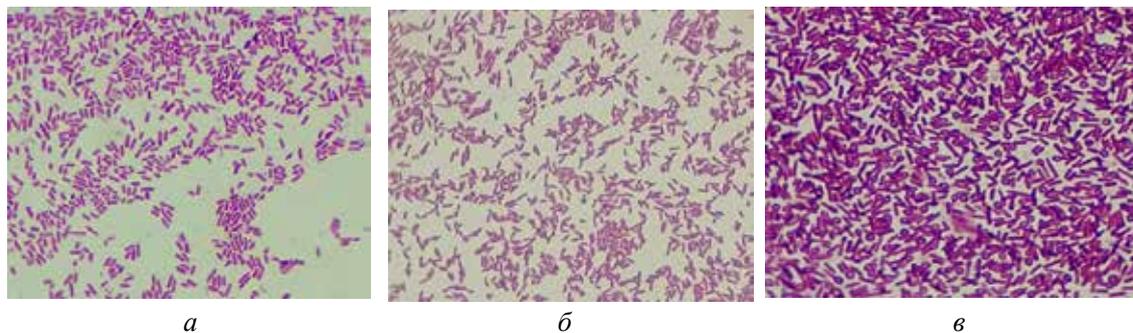


Рис. 2. Микроскопическая картина изолятов (по Граму), ×100: а) 855, б) 858, в) В4

Одной из характеристик скрининга является отбор микроорганизмов для дальнейшей работы по максимальному показателю ЖСП, чтобы иметь клетки с хорошей выживаемостью в различных условиях.

Всего из БУ и навоза КРС было получено 18 чистых культур. Из них 13 культур выделены из БУ (№ 846, № 847, № 848, № 849, № 850, № 851, № 852, № 853, № 854, № 855, № 856, № 857, № 858) и 5 чистых культур из навоза КРС: В3, В4, В5, В6, В7. Максимальный показатель ЖСП варьирует в пределах  $10^6$ – $10^8$  КОЕ/мл.

Изучение ферментативной активности полученных изолятов, а именно активности гидролаз, показало, что 12 выделенных культур обладают протеолитической активностью: 846, 848, 850, 852, 853, 854, 856, 857, В3, В5, В6, В7. Наиболее активными были изоляты № 854, В6. Протеолитические ферменты (протеазы) катализируют расщепление белков на поли- и олигопептиды. Протеазы выделяются различными видами бацилл, актиномицетов, мицелиальных грибов и другими микроорганизмами. Активность внеклеточных протеаз опреде-

ляли, используя в качестве субстрата желатин и казеин [9].

Амилитической активностью обладали только два изолята – В5 и В6. Целлюлозу разлагали 11 культур: 846, 848, 852, 853, 854, 855, 856, 858, В3, В5, В6.

Способность разложения мочевины до аммиака отмечена у следующих изолятов: 846, 847, 849, В6. Уреаза – фермент, участвующий в регуляции азотного обмена в почве. Этот фермент катализирует гидролиз мочевины до аммиака и углекислого газа, вызывая гидролитическое расщепление связи между азотом и углеродом в молекулах органических веществ [10].

Липолитическую активность проявляли изоляты 846, 851 и 857. Липиды подвергаются гидролитическому разложению под действием липаз. Для выявления липолитической активности использовали твин [11].

Результаты представлены в табл. 2.

На рис. 3 представлены фотографии изолятов с протеолитической, амилитической, целлюлозолитической, уреолитической и липолитической активностями.

Таблица 2

Ферментативная активность изолятов

Изоляты	Амилазная активность	Протеализ казеин	Целлюлаза	Уреазная активность	Липаза
№ 846	-	+	+++	+++	+++
№ 847	-	-	-	+++	-
№ 848	-	+	+++	-	-
№ 849	-	-	-	+++	-
№ 850	-	+	-	-	-
№ 851	-	-	-	-	+
№ 852	-	+	+++	-	-
№ 853	-	+	+++	-	-
№ 854	-	++	+++	-	-
№ 855	-	-	+++	-	-
№856	-	+	+++	-	-
№857	-	+	-	-	+
№858	-	-	++	-	-
В3	-	+	+++	-	-
В4	-	-	-	-	-
В5	+	+	+++	-	-
В6	+	+++	++	+	-
В7	-	+	-	-	-

Примечание:

- - отсутствие активности
- + – активность выражена слабо
- ++ – средняя активность
- +++ – высокая активность

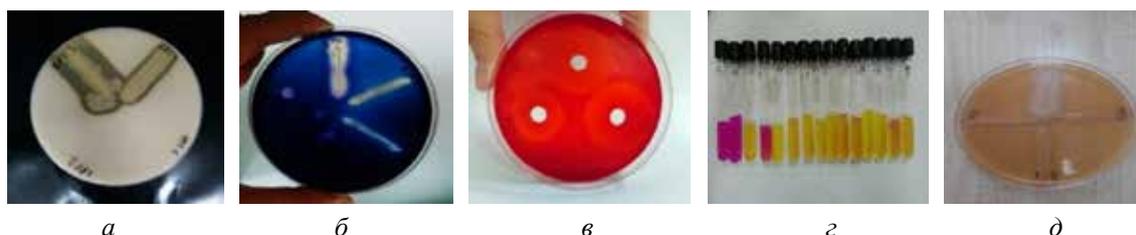


Рис. 3. Ферментативная активность выделенных культур микроорганизмов: а – протеолиз (B6 и B7), б – амилолитическая (B5 и B6), в – целлюлозная (853, 854, 855), г – уреазная (846, 847, 849), д – липолиз (846)

Таблица 3

Видовая принадлежность изолятов (Maldi-TOF, Bruker)

Наименование культуры	Источник выделения	Идентификация Maldi	Диапазон идентификации*
№ 846	Субстрат с БУ	<i>Ochrobactrum tritici</i>	<u>1.888</u>
№ 847	Субстрат с БУ	<i>Ochrobactrum tritici</i>	<u>1.882</u>
№ 848	Субстрат с БУ	<i>Bacillus pumilus</i>	<u>1.864</u>
№ 849	Субстрат с БУ	<i>Pseudomonas citronellolis</i>	<u>2.298</u>
№ 851	Субстрат с БУ	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	<u>2.152</u>
№ 852	Субстрат с БУ	<i>Bacillus pumilus</i>	<u>1.975</u>
№ 853	Субстрат с БУ	<i>Bacillus pumilus</i>	<u>1.905</u>
№ 854	Субстрат с БУ	<i>Bacillus pumilus</i>	<u>2.003</u>
№ 855	Субстрат с БУ	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	<u>2.107</u>
№ 856	Субстрат с БУ	<i>Bacillus pumilus</i>	<u>1.922</u>
№ 857	Субстрат с БУ	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	1.926
№ 858	Субстрат с БУ	<i>Bacillus cereus</i>	<u>1.712</u>
B3	Навоз КРС	<i>Bacillus subtilis</i>	<u>2.108</u>
B5	Навоз КРС	<i>Escherichia coli</i>	<u>2.398</u>
B6	Навоз КРС	<i>Bacillus cereus</i>	2.344

На основе полученных данных нами были отобраны наиболее активные гидролитические изоляты, которые были идентифицированы по методу MALDI-TOF. Из 18 изолятов для дальнейшей работы отобрано 15 изолятов, обладающих наиболее высокими ферментативными свойствами. Результаты идентификации активных изолятов микроорганизмов методом масс-спектрометрии представлены в табл. 3.

Результаты идентификации по MALDI-TOF, с высокой степенью идентификации штаммов с гомологией нуклеотидной последовательности 98–100%.

В результате проведения генетической идентификации отобранных изолятов по MALDI-TOF выделенные микроорганизмы отнесены к *Ochrobactrum tritici*, *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas citronellolis*, *Lysinibacillus sphaericus*, *Acinetobacter johnsonii*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*.

### Заключение

В Казахстане очень остро стоит проблема переработки животноводческих отходов. Эту проблему можно решить путем анаэробной ферментации с применением ферментативно активных микроорганизмов для ускорения процесса. В результате проведенных исследований из БУ и навоза КРС были выделены различные микроорганизмы. Изучены их культурально-морфологические и физиологические свойства. Отобрано 15 активных штаммов микроорганизмов для создания заквасок с целью бесперебойной работы БУ.

Ценность полученных данных заключается в получении из активных штаммов бактерий, перспективных для ускоренной переработки органических отходов и получения метана. Данные могут стать толчком для разработки новой отечественной микробной добавки для анаэробной ферментации органических отходов.

## Список литературы

1. Burg V., Bowman G., Haubensak M., Baier U., Thees O. Valorization of an Untapped Resource: Energy and Greenhouse Gas Emissions Benefits of Converting Manure to Biogas through Anaerobic Digestion. *Resour. Conservation Recycling*. 2018. № 136. P. 53–62.
2. Hou Y., Velthof G.L., Lesschen J.P., Staritsky I.G., Oenema O. Nutrient Recovery and Emissions of Ammonia, Nitrous Oxide, and Methane from Animal Manure in Europe: Effects of Manure Treatment Technologies. *Environ. Sci. Technol.* 2017. № 51. P. 375–383.
3. Ahlberg Eliasson K\*, Liu T., Nadeau E., Schnürer A. Forage types and origin of manure in co-digestion affect methane yield and microbial Community structure. *Grass and Forage Science*. 2018. № 73. P. 1–18.
4. Nolan S., Waters N.R., Brennan F., Auer A., Fenton O., Richards K. Toward Assessing Farm-Based Anaerobic Digestate Public Health Risks: Comparative Investigation with Slurry, Effect of Pasteurization Treatments, and Use of Miniature Bioreactors as Proxies for Pathogen Spiking Trials. *Front. Sust Food Syst.* 2018. P. 1–11. DOI: 10.3389/fsufs.2018.00041.
5. Chandra R., Takeuchi H., Hasegawa T. Methane production from lignocellulosic agricultural crop wastes: a review in context to second generation of biofuel production. *Renew Sustain Energy Rev.* 2012. No. 16 (3). P. 1462–1476.
6. Давлетшина Г.К., Туйгунов М.М., Габидуллин Ю.З., Ахтариева А.А., Булгаков А.К., Савченко Т.А. Микробиологические методы: учебное пособие. Уфа: Издательство ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России, 2018. 119 с.
7. Verma R., McCormick M., Michel J.-B. Biogas production to mitigate Green House Gas Emission. *International Journal of Engineering and Technical Research (IJETR)*. 2016. Vol. 5. Issue 4. P. 76–83.
8. Melanie Pavlovic, Ingrid Huber, Regina Konrad, Ulrich Busch. Application of MALDI-TOF MS for the identification of food borne bacteria. *Open Microbiol. J.* 2013. Vol. 7. P. 135–141.
9. Осадчая А.И., Сафронова Л.А., Авдеева Л.В., Иляш В.М. Скрининг штаммов с высокой целлюлазной активностью // *Микробиологический журнал*. 2009. Т. 71. № 5. С. 41–48.
10. Егорова Н.С., Аркадьева З.А., Безбородов А.М., Блохина И.Н. и др. Промышленная микробиология: учебное пособие для ВУЗов по специальности «Микробиология», «Биология». М.: Высшая школа, 1989. 688 с.
11. Логинова Л.Г. Микробиологические аспекты сверхсинтеза ферментов микроорганизмами // *Известия АН СССР. Серия биол.* 1989. № 5. С. 682–688.