

**Э.Ж. Хасенова*, А.Ж. Аюпова, Э.Б. Молдагулова,
А.С. Сарсенова, Н.Б. Молдагулова, Э. Нагызбеккызы**

ТОО «Экостандарт.kz», Казахстан, г. Нур-Султан

*e-mail: elmira_alta@mail.ru

ВЫДЕЛЕНИЕ БАКТЕРИЙ, ПЕРСПЕКТИВНЫХ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ОРГАНОМИНЕРАЛЬНОГО БИОУДОБРЕНИЯ, ИЗ ОСАДКОВ СТОЧНЫХ ВОД

В статье приводятся данные по выделению бактерий из иловых осадков сточных вод, перспективных для получения органоминерального биоудобрения, изучению их ферментативной активности (липазная, протеолитическая, амилазная, углеводородокисляющая) и способности к утилизации иловых осадков. Отбор проб для проведения исследований проводили на станциях очистных сооружений городов Нур-Султан и Рудный. Из городских бытовых стоков в процессе скрининга было отобрано 6 активных культур микроорганизмов (AK1, AK2, AK3, AI1, AI4, PI7), обладающих высокой биологической активностью. Идентификацию микроорганизмов проводили генотипированием по консервативному локусу 16S rRNA. Культуры были идентифицированы *Bacillus mojavensis*, *Bacillus fusiformis*, *Bacillus amylooligofaciens*, *Pseudomonas lundensis*, *Enterobacter* sp. и *Ochrobactrum* sp.

Результаты лабораторных экспериментов по утилизации илов городских бытовых стоков показали, что наибольшей активностью обладают бактерии *Enterobacter* sp. и *Ochrobactrum* sp. Степень утилизации ила в модельных экспериментах достигает до 70%. Ассоциация из трех штаммов бактерий рода *Bacillus* была менее эффективна в процессе утилизации ила по сравнению с монокультурами *Enterobacter* sp. и *Ochrobactrum* sp. Исследуемые нами микроорганизмы можно считать перспективными для дальнейшей переработки органических отходов и разработки на их основе технологии получения органоминерального удобрения.

Ключевые слова: иловые осадки, удобрения, микроорганизмы, отходы, переработка, утилизация.

**E.Zh. Khassenova*, A.Zh. Ayupova, Э.Б. Молдагулова,
A.S.Sarsenova, N.B. Moldagulova, E. Nagyzbekkyzy**

LLP «Ecostandard.kz», Kazakhstan, Nur-Sultan

*e-mail: elmira_alta@mail.ru

Isolation of bacteria prospective for obtaining organomineral biomineral fertilization from waste water sediments

Biological preparations are modern and effective means for processing waste, as a result of the use of which it is possible to obtain high-quality organic fertilizers rich in nitrogen compounds, which do not contain pathogenic microflora and helminth larvae. In recent years, many problems have arisen around the sewage treatment facilities in the country with the disposal of sludge in sludge maps. The method of biological fermentation and utilization using active strains of microorganisms is proposed as an effective solution to this issue.

The article presents the results of studies on the isolation of bacteria from sewage sludge, promising for the production of organic-mineral biofertilizer, the study of their enzymatic activity and the ability to utilize sludge. Sludge samples were taken from treatment facilities in Nur-Sultan city and Rudny town. Six active strains were isolated: *Bacillus mojavensis*, *Bacillus fusiformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Pseudomonas lundensis*, *Enterobacter* sp. and *Ochrobactrum* sp. Bacteria were identified by 16S rRNA method.

The results of laboratory experiments on the disposal of sludge from municipal wastewater have shown that the bacteria *Enterobacter* sp. and *Ochrobactrum* sp. have the highest activity. Sludge utilization in model experiments was observed up to 70%. The association of three bacterial strains of the genus *Bacillus* was less efficient in the process of sludge utilization compared to monocultures of *Enterobacter* sp. and *Ochrobactrum* sp. In general, the experiments have shown the promise of using microbial biomass for the disposal of sludge from urban wastewater. Prospective strains include *Enterobacter* sp. and *Ochrobactrum* sp. with 47% and 69% of sludge utilization, respectively.

Key words: sludge, fertilizers, microorganisms, waste, processing, disposal.

Э.Ж. Хасенова*, А.А. Жюпова, Э.Б. Молдагулова,
А.С. Сарсенова, Н.Б. Молдагулова, Э. Нагызбеккызы
«Экостандарт.kz» ЖШС, Қазақстан, Нұр-Сұлтан қ.
*e-mail: elmira_alta@mail.ru

Кәріз суларының шөгінділерінен органоминералды тыңайтқыштар жасау үшін перспективалы штамдарды бөліп алу

Биологиялық препараттар қалдықтарды өңдеудің заманауи және тиімді құралы болып табылады, нәтижесінде азотты қосылыстарға бай, құрамында патогенді микрофлора, гельминт личинкалары жоқ жоғары сапалы органикалық тыңайтқыштар алуға болады.

Соңғы жылдары елдегі кәріз тазарту қондырғыларының айналасында тұнба карталарында кәріз шөгінділерінің жойылуымен көптеген проблемалар туындады. Сондықтан микроорганизмдердің белсенді штамдары арқылы биологиялық ферменттеу және жою әдісі ұсынылады.

Мақалада кәріз суларының шөгінділерінен бөлініп алынған бактериялардың зерттеу нәтижелері көрсетілген, олардан органоминералды биотыңайтқыштар алу үшін, ферменттік белсенділігі мен кәріз шөгінділерінің қайта өңдеуге қабілеттілігін зерттеу. Кәріз суларының шөгінді сынамалары Нұр-Сұлтан мен Рудный қалаларының тазарту құрылғыларынан алынды. 6 белсенді штамдар анықталды: *Bacillus mojavensis*, *Bacillus fusiformis*, *Bacillus amyloligefaciens*, *Pseudomonas lundensis*, *Enterobacter sp.* және *Ochrobactrum sp.* Бактерияларды анықтау 16s rRNA әдісімен жүргізілді.

Қалалық кәріз суларының шөгінділерінен бөлініп алынған зертханалық тәжірибелердің нәтижелері бактериялардың *Enterobacter sp.* және *Ochrobactrum sp.* екенін көрсетті. Модельдік эксперименттерде кәріз суларының шөгінділерін жою 70%-ға дейін байқалды. Қалдықтарды жою процесінде *Enterobacter sp.* және *Ochrobactrum sp.* монокультурасымен салыстырып қарағанда *Bacillus* тұқымының 3 штаммының құрылған жиынтықтың тиімділігі аз байқалды. Жалпы эксперимент нәтижесі қалалық кәріз сулардың шөгіндісін өңдеуде микробтық биомассаны қолдану жақсы көрсеткіш көрсетті. Шөгінділерді қайта өңдеу кезінде сәйкесінше 47% және 69% құрайды, перспективалы штамдарға *Enterobacter sp.* және *Ochrobactrum sp.* жатады.

Осылайша, біз зерттеген микроорганизмдер органикалық қалдықтарды одан әрі өңдеуде және олардың негізінде органоминералды тыңайтқыштар алу технологиясының даму саласында перспективалы деп санауға болады.

Түйін сөздер: шлам, тыңайтқыштар, микроорганизмдер, қалдықтар, өңдеу, кәдеге жарату.

Введение

На сегодняшний день перспективным и недорогим методом утилизации образующихся иловых осадков является использование их в качестве био-, органоминерального и азотно-фосфорного удобрения. Иловые осадки не зависимо от их вида оказывают существенное влияние на показатели потенциального плодородия почвы. В процессе интенсификации земледелия и недостаточного внесения в почву органического вещества приводят к излишней минерализации почвы – основного носителя плодородия. Отсюда возникает острая необходимость максимального увеличения производства всех видов органических удобрений, в том числе нетрадиционных [1-5].

В последние годы наряду с применением в качестве удобрений сельскохозяйственных и птицеводческих отходов, большой интерес представляет использование в качестве местного удобрения канализационного ила – ОСВ городских очистных сооружений [6-11]. Данный метод утилизации иловых осадков наиболее на-

дежный и экологически выгодный, так как его можно использовать в качестве органоминерального биоудобрения, при этом одновременно решается ряд задач: исключается необходимость захоронения, повышается плодородие почв и урожайность сельскохозяйственных культур, а самое главное не загрязняется окружающая природная среда. Не секрет, что ил со станций очистки сточных вод общественной канализации представляет собой важнейший источник органических, питательных и биологически активных веществ [12-16].

Непосредственное удобрение илом со станций очистки сточных вод является выгодным способом использования этих отходов, если они используются соответствующим образом при определенных природных и производственных условиях. В технологическом цикле очистки сточных вод получают различные типы осадков, которые по своим удобрительным качествам могут резко отличаться друг от друга. Для обезвоживания ОСВ могут использовать известь, хлорное железо [17-19].

ОСВ содержат в большом количестве не только биогенные элементы, но и богаты активными почвенными микроорганизмами. Микробиоценоз иловой массы представлен разнообразными почвенными бактериями, относящимися к различным таксономическим группам бактерий, грибов, актиномицетов и дрожжей. Не исключается наличие в них патогенных и условно патогенных бактерий и вирусов [20-21].

В последние годы вокруг канализационно-очистных сооружений (КОС) столицы нашей страны возникло много проблем с утилизацией осадков в иловых картах. Возникшую проблему решили методами захоронения. Но проблема на этом не решилась, так как вновь образующиеся осадки возрастают в объемах. За месяц в столичном КОС образуется более 50 тыс. тон осадков. В данное время остро стоит вопрос об утилизации обезвоженной после очистки иловой массы.

Материалы и методы исследований

Выделение культур микроорганизмов проводили из сточной воды и ила методом накопительных культур с последующим высевом на селективные среды [22]. Проверку чистоты культур проводили методом микроскопии по Граму [23].

Методика выделения микроорганизмов заключалась в приготовлении пробы активного ила и воды, посева их на селективные среды, визуальном анализе выросших колоний [24].

Пробу из надосадочного слоя активного ила в объеме 1 мл высевали на пластинки селективной среды. Посевы инкубировали в течение пяти суток, после чего проводили учет результатов (анализ роста культур микроорганизмов).

Культуральные свойства выделенного изолята определяли визуально, анализируя изолированные колонии. Определяли вид колонии, ее окраску, размеры, форму, профиль и характер края. Чистые культуры микроорганизмов обязательно контролировали под микроскопом.

Идентификацию микроорганизмов проводили генотипированием по консервативному локусу *16S r DNA* [25].

Результаты исследований и их обсуждение

Отбор проб для проведения исследований проводили на станциях очистных сооружений г. Нур-Султан и г. Рудный. Были отобраны пробы ила и сточной воды из отстойников вторичной очистки.

Оценка количества микроорганизмов в сточной воде определялась методом предельных разведений и посевом суспензий клеток на различные питательные среды: МПА, Эшби, Сабуро и MRS-4. В сточной воде максимальное значение КОЕ из отстойников вторичной очистки составила 20×10^6 кл/мл, в иле – 38×10^6 кл/мл.

Анализ таксономических групп микроорганизмов показал, что более 90% микробной флоры представлен бактериальными культурами.

Выделение микроорганизмов из образцов, взятых из сточной воды и ила, проводили методом накопительных культур. Чистые культуры аэробных микроорганизмов пересеивали на плотные питательные среды МПА, СПА, МРС-4, Сабуро методом истощающего штриха по Гоулду.

Инкубацию культур производили при 20°C и 37°C, в течение 48-72 часов. Чистоту выделенных культур микроорганизмов оценивали общепринятыми методами – микроскопическим контролем по Граму и высевом на среду МПА. Выявлено, что в илах бытовых стоков присутствовали грамотрицательные и грамположительные бактерии.

На первоначальном этапе изучение выделенных микроорганизмов проводили по культурально-морфологическим признакам – характеру роста культур на плотной и в жидкой среде.

В выделенных культурах доминировали микроорганизмы с колониями бежевого цвета. Так же встречались колонии оранжевого и красного цвета.

Колонии бежеватого оттенка образовывали шероховатых колонии с матовым оттенком, с плоским профилем колонии, однородной массы, плотной консистенции. Размеры колоний колебались от 0,1 до 0,3 мм. Одна из выделенных культур оказалась способной к синтезу слизи. Колонии красного цвета имели четкую границу, профиль представлял гладкую, блестящую выпуклую колонию, консистенция маслянистая, однородная. Размеры колонии колебались от 0,1 до 0,3 мм. Оранжевые колонии также имели четкую границу, колонии гладкие, блестящие, выпуклые, однородной консистенции. Размеры колонии колебались от 0,1 до 0,2 мм.

На жидкой среде культуры давали рост в виде равномерного помутнения, который в статике образовал обильный осадок рыхлой консистенции. Большинство выделенных культур показывали высокую скорость роста клеток на питательных средах СПА и МПА. Четыре культуры, культивируемые на среде МРС, образовывали кисло-сладкий запах.

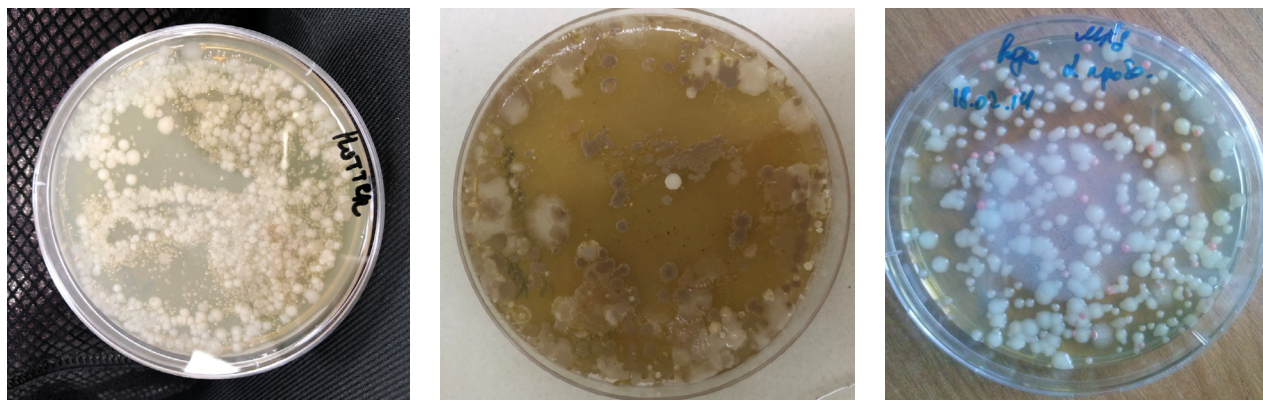


Рисунок 1 – Выделение микроорганизмов из накопительных сред

Все выделенные чистые культуры закладывали на долгосрочное хранение методом криоконсервации с применением осмопротекторной среды для сохранения их биохимических и биологических свойств при температуре минус 80°C.

Следующим этапом работ было изучение ферментативной активности отобранных штаммов. Определялась амилалитическая, протеолитическая, целлюлолитическая, липазная и углеводородокисляющая активности, а также способность к деструкции ксенобиотиков.

Для выделения физиологически активных штаммов микроорганизмов культивирование проводили на питательной и минеральной среде Ворошиловой–Диановой с добавлением нефти (1%), твин-80 (1%), сульфанола (0,1%) и фильтровальной бумаги в качестве единственного источника углерода.

При культивировании микроорганизмов с нефтью в качестве единственного источника углерода выявило 6 штаммов (АК1, АК2, АК3, АИ1, АИ4, РИ7), способных утилизировать нефть. Деструкции жиров изучали (липазная активность) по зонам просветления (твин-80) выделенными штаммами выявило 8 активных культур (РИ1, Э3, И4, М9 АК1, АК2, АИ4, РИ7). При этом амилалитической активностью обладали 5 культур (АК3, АИ1, АИ4, РИ7, М7). Размеры зоны гидролиза колебались в пределах 0,6-1,8 мм. Восемь культур (АК1, И4, АК2, М29, АИ4, РИ7, РИ1, АК3) расщепляли казеин на молочном агаре. Способность отобранных культур разрушать синтетические поверхностно активные вещества (сульфонол) проводили с использованием биохимического теста с индикатором 2,3,5-трифенилтетразолий хлорид (ТТХ). Два штамма (РИ1, АК3) выделенных микроорганизмов дали положительный биохимический

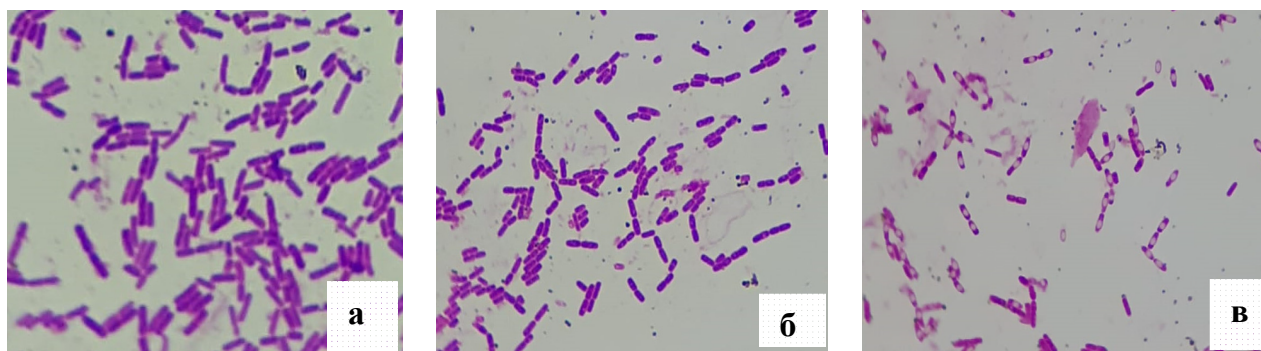
тест на ТТХ. При культивировании микроорганизмов на жидкой среде Гетчинсона с добавлением фильтровальной бумаги только 2 культуры (АК1, АИ4) проявили способность разрушать целостность фильтровальной бумаги и образовывать хлопьевидное помутнение среды.

В результате проведенных исследований для дальнейших работ по утилизации илов городских бытовых стоков было отобрано 6 активных культур микроорганизмов (АК1, АК2, АК3, АИ1, АИ4, РИ7), обладающих высокой биологической активностью.

Для определения родовой и видовой принадлежности активных выделенных культур микроорганизмов были изучены их культурально-морфологические и биохимические свойства общепринятыми методами в соответствии с определителем Берджи путем постановки дифференциальных тестов и опытов, а также с использованием генетических методов, таких как ПЦР и сиквенс-анализ.

Видовую и родовую принадлежность выделенных активных изолятов определяли по культуральным признакам жизнеспособных клеток, описывая характер роста, структуру и размеры колоний. Макроморфология чистых культур была представлена в виде средних, округлых, плоских и выпуклых колоний, диаметром от 0,5 до 1 мм., с гладкой, морщинистой, блестящей поверхностью, с ровными и волнистыми краями, структура однородная, консистенция пастообразная. Колонии бесцветные, пигмент в среду не выделяют, аэробы.

Окраска по Грамму выявила наличие грамположительных и грамотрицательных прямых палочек размером 0,5-2,5 x 1,2-10 мкм, с закругленными или обрубленными концами, расположенных одиночно, попарно или в цепочку (рисунок 2).



а – штамм микроорганизмов АК1; б – штамм микроорганизмов АК2; в – штамм микроорганизмов АК3

Рисунок 2 – Окраска клеток микроорганизмов по Грамму

На рисунке 2 представлена микроскопия выделенных чистых культур.

Дальнейшая идентификация 6 штаммов бактерий была осуществлена методом определения прямой нуклеотидной последовательности фрагмента *16S rRNA* гена, с последующим определением нуклеотидной идентичности с последовательностями, депонированными в международной базе данных Gene Bank.

Выделение ДНК проводили по методу Kate Wilson, который позволяет эффективно выделять ДНК как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий.

Аmplification фрагмента *16S rRNA* гена. Реакция ПЦР была выполнена с универсальными праймерами 8f 5' – AgAgTTTgATCCTggCTCAg-3 и 806R- 5' ggACTACCAgggTATCTAAT в общем объеме 20 мкл. ПЦР смесь содержала 150 нг ДНК, 1Ед. Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase (Fermentas), 0,2 mM каждого дНТФ, 1-х ПЦР буфер (Fermentas), 2,5 mM MgCl₂, 10 пмоль каждого праймера. Программа ПЦР амплификации включала длительную денатурацию 95°C в течение 7 минут; 30 циклов: 95°C – 30 секунд, 55°C- 40, 72°C – 1 минута; заключительная элонгация 7 минут при 72°C, ПЦР программа была выполнена с применением амплификатора GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems).

Определение нуклеотидной последовательности. Очистку ПЦР продуктов от не связанных праймеров проводили ферментативным методом используя, Exonuclease I (Fermentas) и щелочную фосфатазу (Shrimp Alkaline Phosphatase, Fermentas).

Реакцию секвенирования проводили с применением BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) согласно инструкции производителя, с последующим раз-

делением фрагментов на автоматическом генетическом анализаторе 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems).

Анализ нуклеотидных последовательностей. Нуклеотидные последовательности *16S rRNA* гена 6 идентифицируемых штаммов были анализированы и объединены в общую последовательность в программном обеспечении SeqScape 2.6.0 (Applied Biosystems). После чего были удалены концевые фрагменты (нуклеотидные последовательности праймеров, фрагменты, имеющие низкий показатель качества), что позволило нам получить нуклеотидную последовательность протяженностью 730 п.н., которые были идентифицированы в GeneBank по алгоритму BLAST. Результаты идентификации представлены в таблице 1.

Данные таблицы 1 свидетельствуют, что гомология нуклеотидной последовательности идентифицированных культур составила на 98-99%.

Таким образом, в результате фено- и генетической идентификации были идентифицированы 6 штаммов микроорганизмов с гомологией нуклеотидной последовательности 98-99%.

Исследование толерантности отобранных штаммов микроорганизмов выделенных из сточных вод и илов очистных сооружений показало, что культуры *Bacillus mojavensis*, *Bacillus fusiformis*, *Bacillus amyloligiefaciens*, *Enterobacter sp.* и *Ochrobactrum sp.* не проявляют антагонистических отношений, однако полностью подавляют рост *Pseudomonas lundensis*. Антагонистические отношения выделенных штаммов проверяли методом перпендикулярных штрихов. Создан консорциум на основе выделенных культур, состоящий из 3 штаммов: *Bacillus mojavensis* АК1, *Bacillus fusiformis* АК2, *Bacillus amyloligiefaciens* АК3.

Таблица 1 – Результаты идентификации штаммов по фрагменту *16S rRNA* гена

Наименование изолята	Результат идентификации	Процент гомологии, %
АК1	<i>Bacillus mojavenis</i>	99
АК2	<i>Bacillus fusiformis</i>	99
АК3	<i>Bacillus amylogiefaciens</i>	98
АИ1	<i>Pseudomonas lundensis</i>	98
АИ4	<i>Enterobacter sp.</i>	98
РИ7	<i>Ochrobactrum sp.</i>	99

Проводили лабораторные эксперименты по утилизации илов городских бытовых стоков. Культивирование микроорганизмов проводили на смеси ила и сточной воды в лабораторных условиях при температуре 28 °С на качалке со скоростью вращения 150 об/мин.

Подготовка среды культивирования: в пробирку вносили 2 мл ила (полужидкого) смешивали с 18 мл сточной воды и стерилизовали те-

кучим паром (по Коху) трижды с интервалом в 2 суток для максимального сохранения органических веществ. Инокулят готовили следующим образом – чистые, 3-х суточные культуры, выращенные на косяках СПА, смывали стерильным физиологическим раствором и ресуспендировали. Суспензию клеток доводили до определенной концентрации и заражали ил, чтобы конечная концентрация клеток в среде составляла $2,3-2,5 \times 10^7$ кл/мл.

Пробы отбирали через 14 и 28 суток с целью определения динамики процесса прироста биомассы и деструкции ила. В эксперименте в качестве контроля использовали сточную воду + ил, стерилизация текучим паром. Совместно с чистыми выделенными культурами также использовался консорциум, состоящий из трех разных штаммов рода *Bacillus*.

Оценку утилизации ила проводили гравиметрическим методом. Одновременно проверяли гидрофильность-гидрофобность сухого остатка. Результаты модельного эксперимента приведены в таблице 2

Таблица 2 – Степень утилизации ила и прироста биомассы на сточной воде с илом

14 сутки					28 сутки				
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
№ пробы	Титр клеток, КОЕ, кл/мл	Запах	Δ масса сухого ила (г)	Утилизация ила, %	№ пробы	Титр клеток, КОЕ, кл/мл	Запах	Δ масса сухого ила (г)	Утилизация ила, %
АК1 ¹	$2,1 \times 10^9$	+	0,067	5%	АК1 ¹	$5,9 \times 10^9$	-	0,061	14%
АК1 ²	$1,9 \times 10^9$	+			АК1 ²	$3,9 \times 10^9$	-		
АК1 ³	$2,1 \times 10^9$	+			АК1 ³	$4,2 \times 10^9$	-		
АК2 ¹	$1,3 \times 10^9$	+	0,063	11%	АК2 ¹	$1,7 \times 10^9$	-	0,051	28%
АК2 ²	5×10^8	++			АК2 ²	1×10^9	-		
АК2 ³	$6,7 \times 10^8$	-			АК2 ³	$1,5 \times 10^9$	-		
АК3 ¹	$8,5 \times 10^8$	+	0,061	14%	АК3 ¹	$1,2 \times 10^9$	-	0,056	21%
АК3 ²	$1,9 \times 10^8$	+			АК3 ²	$1,5 \times 10^9$	-		
АК3 ³	$2,1 \times 10^8$	++			АК3 ³	$1,1 \times 10^9$	-		
АИ14 ¹	2×10^7	++	0,062	12%	АИ14 ¹	$3,1 \times 10^8$	-	0,055	22,5%
АИ1 ²	2×10^7	++			АИ1 ²	$3,9 \times 10^8$	-		
АИ1 ³	$1,9 \times 10^8$	++			АИ1 ³	$3,1 \times 10^8$	-		
АИ4 ¹	4×10^8	+	0,055	22%	АИ4 ¹	$2,8 \times 10^9$	-	0,037	47%
АИ4 ²	$1,6 \times 10^9$	+			АИ4 ²	$1,8 \times 10^9$	-		
АИ4 ³	8×10^8	+			АИ4 ³	$2,4 \times 10^9$	-		

Продолжение таблицы 2

14 сутки					28 сутки				
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
№ пробы	Титр клеток, КОЕ, кл/мл	Запах	Δ масса сухого ила (г)	Утилизация ила, %	№ пробы	Титр клеток, КОЕ, кл/мл	Запах	Δ масса сухого ила (г)	Утилизация ила, %
РИ7 ¹	2,4x10 ⁹	++	0,048	32%	РИ7 ¹	5,9x10 ⁸	-	0,022	69%
РИ7 ²	1,3x10 ⁹	+			РИ7 ²	6,7x10 ⁸	-		
РИ7 ³	2,1x10 ⁹	++			РИ7 ³	6,3x10 ⁸	-		
Консорц ¹	-	-	0,062	12%	Консорц ¹	-	-	0,055	23%
Консорц ²	-	++			Консорц ²	-	+		
Консорц ³	-	+			Консорц ³	-	-		

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
К ¹	-	++	-	-	К ¹	-	+	-	-
К ²	-	++			К ²	-	+	-	-
К ³	-	++			К ³	-	+	-	-

Примечания: 1 «++» – сильный, резкий запах; 2 «+» – осязаемый запах; 3 «-» – отсутствие запаха

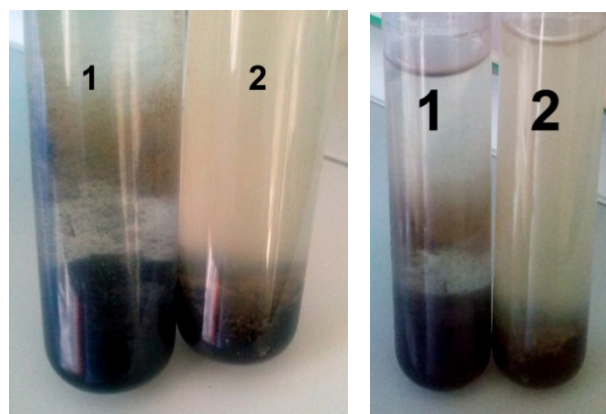
Из данных таблицы 2 видно, что наименьшую активность по утилизации ила наблюдается у *Bacillus mojavensis*. Прирост клеток увеличился на 2 порядка на 14 сутки эксперимента, к концу эксперимента – еще в 2 раза.

Штаммы *Bacillus fusiformis*, *Bacillus amyloligiefaciens* и *Pseudomonas lundensis* показали средние значения как по приросту биомассы, так и по утилизации ила показали. При использовании штамма *Pseudomonas lundensis* наблюдалось медленное размножение клеток.

Самые высокие показатели по утилизации ила показали культуры *Enterobacter sp.* и *Ochrobactrum sp.* на 28 сутки – 47 и 69% соответственно. Эти же культуры показали хорошие результаты по приросту биомассы.

Биологический контроль также показал среднее значение по утилизации ила (в пределах 3-х культур *Bacillus* и *Pseudomonas*). К сожалению, оценку прироста биомассы проверить не представилось возможным.

На 14 сутки эксперимента осадки (илы) в экспериментальных пробирках изменили цвет с угольно-черного до коричневого. К концу эксперимента в опытных образцах ил стал более светлым и рыхлым по консистенции. Наблюдалось также изменение прозрачности раствора (рисунок 3).



а
а- 14 сутки; б – 28 сутки
1- контроль; 2 – *Enterobacter sp.*

Рисунок 3 – Эксперимент по утилизации илов в лабораторных условиях

В ходе эксперимента также оценивался запах по трехбалльной системе: очень резкий, дурнопахнущий (++) , присутствие (наличие) запаха (+) и его отсутствие (-). На 14 сутки практически все пробы обладали запахом, который можно отнести к «++», однако, на 28 сутки эксперимента запах остался только в биологическом и химическом контролях.

По результатам исследования, минимальную активность по утилизации ила имеет штамм *Bacillus mojavensis*. Средние значения как по приросту биомассы, так и по утилизации ила показали *Bacillus fusiformis*, *Bacillus amyloligiefaciens* и *Pseudomonas lundensis*. Медленное увеличение количества клеток *Pseudomonas lundensis* вероятно связано с медленной адаптацией к субстрату.

Самые высокие показатели по утилизации ила показали культуры *Enterobacter sp.* и *Ochrobactrum sp.* на 28 сутки – 47 и 69% соответственно. Эти же культуры показали хорошие результаты по приросту биомассы. Органические вещества являются источником питания для микроорганизмов, за счет чего происходит размножение бактериальных клеток в среде с иловой массой и приводит к накоплению биомассы. Снижение процентного содержания ила свидетельствует о том, что культуры способны утилизировать иловые осадки. Гравиметрический анализ в данном опыте позволяет судить об уменьшении объема иловой массы в исследуемых пробах с внесением микроорганизмов по сравнению с контролем.

В целом эксперимент показал перспективность использования микробной биомассы для утилизации илов городских сточных вод. Перспективными штаммами можно назвать культуры *Enterobacter sp.* и *Ochrobactrum sp.* с 47 и 69% утилизации илов соответственно.

Заключение

На основании полученных экспериментальных данных установлено количественное содержание и таксономическая принадлежность основных групп бактерий в пробах городских бытовых стоков.

Из городских бытовых стоков выделены штаммы микроорганизмов, из которых 6 были отобраны для дальнейших исследований, которые идентифицированы как *Bacillus mojavensis*, *Bacillus fusiformis*, *Bacillus amyloligiefaciens*,

Pseudomonas lundensis, *Enterobacter sp.* и *Ochrobactrum sp.*

Результаты лабораторных экспериментов по утилизации илов городских бытовых стоков показали, что наибольшей активностью обладают бактерии *Enterobacter sp.* и *Ochrobactrum sp.* Утилизация ила в модельных экспериментах наблюдалась до 70%.

Ассоциация из трех штаммов бактерий рода *Bacillus* была менее эффективна в процессе утилизации ила по сравнению с монокультурами *Enterobacter sp.* и *Ochrobactrum sp.*

Таким образом, исследуемые нами микроорганизмы можно считать перспективными для дальнейшей переработки органических отходов и разработки на их основе технологии получения органоминерального удобрения. Биологические препараты являются современными и эффективными средствами для переработки отходов, в результате чего возможно получение качественного органического удобрения, богатого азотными соединениями, не содержащего в своем составе патогенной микрофлоры, личинок гельминтов. В последние годы вокруг канализационно-очистных сооружений в стране возникло много проблем с утилизацией осадков в иловых картах. Поэтому, предлагается метод биологической ферментации и утилизации с помощью активных штаммов микроорганизмов.

Источник финансирования

Работа выполнена при поддержке Национальной программы грантов Казахстана на 2020-2022 годы. Финансирование предоставлено Комитетом науки Министерства образования и науки Республики Казахстан по бюджетной программе 217 «Развитие науки», подпрограмме 102 «Грантовое финансирование научных исследований» по приоритету: «Наука о жизни и здоровье» на 2020-2022 гг., договор №76 от 19 мая 2020 года.

Литература

- 1 Прянишников Д.Н. Учение об удобрении. – М., 1903. – С. 187-189.
- 2 Жук Д.А. Систер В.Г., Таргичина В.Г. Использование осадков сточных вод для улучшения плодородия почвы // сб.статей межд.науч.эколог.конф. «Экологические проблемы развития агроландшафтов и способы повышения их продуктивности». – Краснодар, 2018. – С. 89.
- 3 Шванская Л.П. Использование свежего и зрелого осадка в качестве удобрения // Работы научн. исслед. отд. треста Мосвод. – 1983. – №1. – С. 42-58.
- 4 Нездойминов В.И., Чернышев В.Н., Зайченко Л.Г., Могукало А.В. К вопросу использования осадков сточных вод в качестве органоминерального удобрения // Мат. научн.-практ. конф. «Технологии очистки воды «Техновод-2019». – М., 2019. – С. 232-237.

- 5 Львович А.И. Обеззараживание осадка сточных вод на сельскохозяйственных полях орошения. // Сб.: Докл. IV Межд. конф. по использованию сточных вод для орошения. – Бухарест, 1965. – С. 115-128.
- 6 Ak N., and Dumrul H. 2017. Wastewater treatment unit operations and processes. *Energy Educ. Sci. Tech-C* 9:1–12.
- 7 Abad E., Martínez K., Planas C., Palacios O., Caixach J., and Rivera, J. 2005. Priority organic pollutant assessment of sludges for agricultural purposes. *Chemosphere* 61:1358–1369.
- 8 Ильинский А.В., Сельмен В.Н. Некоторые аспекты применения осадков сточных вод для реабилитации деградированных земель // Сб. статей межд.науч.эколог.конф. «Экологические проблемы развития агроландшафтов и способы повышения их продуктивности». – Краснодар, 2018. – С.100-101.
- 9 V. Muralikrishna, V. Manickam, I. V. Muralikrishna, V. Manickam, *Solid Waste Management, Environ. Manage.* (2017) 431–462. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811989-1.00016-6>.
- 10 B. Sharma, B. Vaish, Monika, U.K. Singh, P. Singh, R.P. Singh, *Recycling of Organic Wastes in Agriculture: An Environmental Perspective, Int. J. Environ. Res.* 13 (2019) 409–429. <https://doi.org/10.1007/s41742-019-00175-y>.
- 11 Сельмен В. Н. Перспективы использования органоминеральных удобрений, полученных на основе осадков сточных вод / В. Н. Сельмен, А. В. Ильинский // Экологические аспекты мелиорации, гидротехники и водного хозяйства АПК : Материалы междунар. науч.-практ. конф. – М. : Изд. ВНИИГиМ, 2017. – С. 225–228.
- 12 Cáceres R, Malińska K, Marfà O (2018) Nitrification within composting: a review. *Waste Manag* 72:119–137
- 13 Архип О.Д. Эффективность осадков сточных вод городов в зависимости от его способа применения. // Система удобрений в интенсивном земледелии. – Кишинев, 1979. – С. 72- 83.
- 14 Туровский И.С. Обработка осадков сточных вод. – М.: Стройиздат, 1982. – 121 с.
- 15 M.R.Q. Silva, T.R. Naik, Review of composting and anaerobic digestion of municipal solid waste and a methodological proposal for a mid-size city, *Sustain. Constr. Mater. Technol. – Int. Conf. Sustain. Constr. Mater. Technol.* (2007) 631–643.
- 16 B.K. Nanjwade, S. Chandrashekhara, A.M. Shamarez, P.S. Goudanavar, F. V. Manvi, Isolation and morphological characterization of antibiotic producing actinomycetes, *Trop. J. Pharm. Res.* 9 (2010) 231–236. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v9i3.56282>.
- 17 Гильманова М.В., Грехова И.В. Восстановление почвенного плодородия нарушенных земель с использованием осадка сточных вод // *Международ.исследовательский журнал*, № 5 (95), Ч.1, 2020. – С. 147.
- 18 Jahnsen S.L. Potsbammets anwandning inom fordbruket. "Vaxt-narinsshytt" 1963, 19. – №1. – P. 1-6.
- 19 Selnur Uçaroğlu and Ufuk Alkan Composting of wastewater treatment sludge with different bulking agents. *Journal of the air & waste management association* 2016, vol. 66, no. 3, 288–295 <http://dx.doi.org/10.1080/10962247.2015.1131205>
- 20 N. Varghese, P.P. Joy, Naveena Varghese, *Microbiol. Lab. Man.* http://prsvkm.kau.in/sites/default/files/documents/microbiology_laboratory_manual.pdf, 2014(accessed 10 April 2020).
- 21 Bożym M., Siemiątkowski G.. Characterization of composted sewage sludge during the maturation process: a pilot scale study. *Environmental Science and Pollution Research* (2018) 25:34332–34342 <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3335-x>
- 22 Теппер Е.З., Шильникова В.К., Переверзева Г.И. Практикум по микробиологии. – М.: «Колос», 1979. – С. 42-79.
- 23 Нетрусов А.Т., Егорова М.А., Захарчук Л.М., Колотилова Н.Н. Практикум по микробиологии. – М.: Академия, 2005. – С. 80-95.
- 24 Нетрусов А.И., Бонч-Осмоловская Е.А., Горленко В.М., Иванов М.В. и др. Экология микроорганизмов. – М.: Академия, 2004. – С. 35-40.
- 25 Wilson K. Preparation of genomic DNA from bacteria in *Current Protocols in Molecular Biology* / Eds. Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A. et al. – New York : Wiley, 1987. – P. 241-245.

References

- 1 Ak N., and Dumrul H. 2017. Wastewater treatment unit operations and processes. *Energy Educ. Sci. Tech-C* 9:1–12.
- 2 Abad E., Martínez K., Planas C., Palacios O., Caixach J., and Rivera, J. 2005. Priority organic pollutant assessment of sludges for agricultural purposes. *Chemosphere* 61:1358–1369.
- 3 Arhip O.D. Effektivnost' osadkov stochnyh vod gorodov v zavisimosti ot ego sposoba primeneniya. // *Sistema udobrenij v intensivnom zemledelii*. – Kishinev, 1979. S. 72- 83.
- 4 B. Sharma, B. Vaish, Monika, U.K. Singh, P. Singh, R.P. Singh, *Recycling of Organic Wastes in Agriculture: An Environmental Perspective, Int. J. Environ. Res.* 13 (2019) 409–429. <https://doi.org/10.1007/s41742-019-00175-y>.
- 5 Bożym M., Siemiątkowski G.. Characterization of composted sewage sludge during the maturation process: a pilot scale study. *Environmental Science and Pollution Research* (2018) 25:34332–34342 <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3335-x>
- 6 B.K. Nanjwade, S. Chandrashekhara, A.M. Shamarez, P.S. Goudanavar, F. V. Manvi, Isolation and morphological characterization of antibiotic producing actinomycetes, *Trop. J. Pharm. Res.* 9 (2010) 231–236. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v9i3.56282>.
- 7 Cáceres R, Malińska K, Marfà O (2018) Nitrification within composting: a review. *Waste Manag* 72:119–137
- 8 V. Muralikrishna, V. Manickam, I. V. Muralikrishna, V. Manickam, *Solid Waste Management, Environ. Manage.* (2017) 431–462. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811989-1.00016-6>.
- 9 Gil'manova M.V., Grekhova I.V. Vosstanovlenie pochvennogo plodorodiya narushennyh zemel' s ispol'zovaniem osadka stochnyh vod // *Mezhdunar.issledovatel'skij zhurnal*, № 5 (95), CH.1, 2020. S.147.
- 10 Il'inskij A.V., Sel'men V.N. Nekotorye aspekty primeneniya osadkov stochnyh vod dlya reabilitacii degradirovannyh zemel' // *sb.statej mezhd.nauch.ekolog.konf. «Ekologicheskie problemy razvitiya agrolandshaftov i sposoby povysheniya ih produktivnosti»*. – Krasnodar, 2018. S.100-101.
- 11 Jahnsen S.L. Potsbammets anwandning inom fordbruket. "Vaxt-narinsshytt" 1963, 19. -№1. -P. 1-6.

- 12 L'vovich A.I. Obezrazhivanie osadka stochnyh vod na zemledel'cheskih polyah orosheniya. -Sb.: Dokl. IV Mezhd. konf. po ispol'zovaniyu stochnyh vod dlya orosheniya. -Buharest, 1965. – S.115-128.
- 13 M.R.Q. Silva, T.R. Naik, Review of composting and anaerobic digestion of municipal solid waste and a methodological proposal for a mid-size city, Sustain. Constr. Mater. Technol. – Int. Conf. Sustain. Constr. Mater. Technol. (2007) 631–643.
- 14 Nezdoinov V.I., Chernyshev V.N., Zajchenko L.G., Mogukalo A.V. K voprosu ispol'zovaniya osadkov stochnyh vod v kachestve organomineral'nogo udobreniya // Mat.nauchn.-prakt.konf. «Tekhnologii ochistki vody «Tekhnovod-2019». – Moskva, 2019. S.232-237.
- 15 N. Varghese, P.P. Joy, Naveena Varghese, Microbiol. Lab. Man. http://prsvkm.kau.in/sites/default/files/documents/microbiology_laboratory_manual.pdf, 2014(accessed 10 April 2020).
- 16 Netrusov A.T., Egorova M.A., Zaharchuk L.M., Kolotilova N.N. Praktikum po mikrobiologii // M.: Akademiya, 2005 g. S. 80-95.
- 17 Netrusov A.I., Bonch-Osmolovskaya E.A., Gorlenko V.M., Ivanov M.V. i dr. Ekologiya mikroorganizmov // M.: Akademiya, 2004 g. S.35-40.
- 18 Pryanishnikov D.N. Uchenie ob udobrenii // M., 1903. – S. 187-189.
- 19 Sel'men V. N. Perspektivy ispol'zovaniya organomineral'nyh udobrenij, poluchennyh na osnove osadkov stochnyh vod / V. N. Sel'men, A. V. Il'inskij // Ekologicheskie aspekty melioracii, gidrotehniki i vodnogo hozyajstva APK : Materialy mezhdunar. nauch.-prakt. konf. – M. : Izd. VNIIGiM, 2017. – S. 225–228.
- 20 Selnur Uçaroğlu and Ufuk Alkan Composting of wastewater treatment sludge with different bulking agents. Journal of the air & waste management association 2016, vol. 66, no. 3, 288–295 <http://dx.doi.org/10.1080/10962247.2015.1131205>
- 21 SHvanskaya L.P. Ispol'zovanie svezhego i zrelogo osadka v kachestve udobreniya // Raboty nauchn. issled. otd. tresta Mosvod. – 1983. – №1. – S.42-58.
- 22 Turovskij I.S. Obrabotka osadkov stochnyh vod. // M.: Strojizdat, 1982.- 121 s.
- 23 Tepper E.Z., SHil'nikova V.K., Pereverzeva G.I. Praktikum po mikrobiologii // M.: «Kolos», 1979. S.42-79.
- 24 Wilson K. Preparation of genomic DNA from bacteria in Current Protocols in Molecular Biology / Eds. Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A. et al. – New York : Wiley, 1987. – P. 241-245.
- 25 ZHuk D.A. Sister V.G., Targichina V.G. Ispol'zovanie osadkov stochnyh vod dlya uluchsheniya plodorodiya pochvy // sb.statej mezhd.nauch.ekolog.konf. «Ekologicheskie problemy razvitiya agrolandshaftov i sposoby povysheniya ih produktivnosti». – Krasnodar, 2018. S.89