

Научная статья
УДК 628.473.24
doi: 10.17223/19988591/66/11

Биоконверсия твердых отходов животноводства с помощью консорциума органотрофных микроорганизмов: результаты опытно-промышленных испытаний

Денис Александрович Ивасенко¹, Юлия Александровна Франк²,
Роман Викторович Перченко³, Данила Сергеевич Рыбкин⁴,
Анна Леонидовна Герасимчук⁵

^{1, 2, 3, 5} Национальный исследовательский Томский государственный университет,
Лаборатория промышленной микробиологии, Томск, Россия
^{1, 2, 4} ООО «Дарвин», Томск, Россия

¹ <https://orcid.org/0000-0001-7132-182X>, ivaskenko.da@mail.ru

² <https://orcid.org/0000-0001-6347-4009>, yulia.a.frank@gmail.com

³ perchenko-roman@mail.ru

⁴ danila.rybkin@gmail.com

⁵ <https://orcid.org/0000-0002-2945-2364>, gerasimchuk_ann@mail.ru

Аннотация. Приведены результаты исследования по выделению микроорганизмов-продуцентов и опытно-промышленному испытанию сконструированного бактериального консорциума для совместного компостирования отходов животноводства (на примере птичьего помета) и деревообработки (опилок хвойных пород) в условиях Западной Сибири. В состав консорциума вошли термофильные и термотолерантные штаммы органотрофных непатогенных бактерий, продуцентов гидролитических ферментов, выделенные из отходов животноводства и избыточного активного ила очистных сооружений в Томской области: *Anoxybacillus kamchatkensis* AS-GOS-2, *Bacillus amyloliquefaciens* PL-1, *Aneurinibacillus thermoaerophilus* PL-5, *Brevibacillus brevis* PM-3, *Pseudoxanthomonas taiwanensis* PM-cell. Тестирование консорциума в ходе совместного компостирования птичьего помета и опилок хвойных пород в соотношении 1:2, проведенное в течение 46 суток при температуре окружающей среды от +3°C до –15°C, показало положительное влияние консорциума на санитарно-паразитологические и микробиологические характеристики использованного помета. Разработанный консорциум может быть рекомендован для компостирования органических отходов в широком технологическом коридоре значений pH и температур.

Ключевые слова: контролируемое компостирование, органические отходы, биоконверсия, микробные консорциумы, термофильные и термотолерантные органотрофные микроорганизмы

Источник финансирования: работа выполнена при поддержке Фонда содействия инновациям (договор № 48ГРСОПР-С7-15/63638 от 11.12.2020 г.) и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (проект № FSWM-2020-0019).

Для цитирования: Ивасенко Д.А., Франк Ю.А., Перченко Р.В., Рыбкин Д.С., Герасимчук А.Л. Биоконверсия твердых отходов животноводства с помощью консорциума органотрофных микроорганизмов: результаты опытно-промышленных испытаний // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2024. № 66. С. 213–233. doi: 10.17223/19988591/66/11

Bioconversion of solid livestock waste using a consortium of organotrophic microorganisms: results of the pilot experiment

Denis A. Ivasenko¹, Yulia A. Frank², Roman V. Perchenko³,
Danila S. Rybkin⁴, Anna L. Gerasimchuk⁵

^{1, 2, 3, 5} Tomsk State University, Laboratory of Industrial Microbiology,
Tomsk, Russian Federation

^{1, 2, 4} Darwin Ltd., Tomsk, Russian Federation

¹ <https://orcid.org/0000-0001-7132-182X>, ivasenko.da@mail.ru

² <https://orcid.org/0000-0001-6347-4009>, yulia.a.frank@gmail.com

³ perchenko-roman@mail.ru

⁴ danila.rybkin@gmail.com

⁵ <https://orcid.org/0000-0002-2945-2364>, gerasimchuk_ann@mail.ru

Summary. Disposal of agro-industrial wastes is one of the major unresolved environmental problems of our time in many countries of the world, and it is associated with adverse impacts on ecosystems due to their improper storage. Composting is considered one of the most attractive ways of using a wide range of organic wastes due to its environmental safety, low cost and the possibility to obtain useful products. In addition to fresh animal and poultry litter, organic wastes such as lignin and cellulosic materials from crop production, wood processing, and others can be used in co-processing systems through microbial bioconversion to produce organic fertilisers or soil mixes. Many existing methods of controlled composting of waste are based on the use of expensive technological techniques and equipment, which significantly increases the cost of the product. Therefore, in addition to increasing the rate of composting, it is very important to simplify the process of obtaining the finished product and also reduce labour and energy costs.

The aim of this study was to isolate and investigate new strains of organotrophic microorganisms, develop a microbial consortium for accelerated composting, and conduct industrial-scale trials of combined composting of animal waste (poultry manure as an example) and wood processing (conifer sawdust) under the conditions of Western Siberia. During this work, the necessity of aeration of the mixture for successful composting of waste was also investigated.

Sampling of organic wastes (poultry manure, swine manure, and pine sawdust) for research purposes was carried out in January-February 2020 at the relevant enterprises of Tomsk and Tomsk district. The obtained samples of poultry and swine manure served as a source for isolation of thermophilic and thermotolerant heterotrophic microorganisms – organic matter decomposers. A total of 7 pure cultures of organotrophic bacteria were isolated from animal waste and identified by molecular methods, most of which were represented by Gram-positive spore-forming cells (see Fig. 1). The only strain that did not form spores was characterised by its ability to degrade cellulose (see Fig. 2). The bacterial strains isolated from animal waste belonged to the families Paenibacillaceae and Bacillaceae within the phylum Bacillota (see Table 1). The strains were selected for the consortium based on their ability to degrade organic matter, including complex polymers, and general physiological properties that determine the biotechnological potential for waste bioconversion. As a result, the consortium included thermophilic and thermotolerant strains of organotrophic non-pathogenic bacteria that produce hydrolytic enzymes: *Bacillus amyloliquefaciens* PL-1, *Aneurinibacillus thermoaerophilus* PL-5, *Brevibacillus brevis* PM-3, and *Pseudoxanthomonas taiwanensis* PM-cell. The consortium also included a thermotolerant organotolerant strain *Anoxybacillus*

kamchatkensis AS-GOS-2, previously isolated from activated sludge of municipal wastewater treatment plant in Tomsk. The physicochemical conditions for the application of the developed consortium are presented in Table 2.

Pilot tests of the technology of joint composting of animal waste (poultry manure) and wood processing waste (coniferous sawdust) using the developed microbial consortium were conducted in October-November 2021 for about 6 weeks. Composting of raw materials was carried out in piles (dimensions 3×3×2 m, volume 18 m³) designated as “PB-1” – experimental pile with consortium application and use of forced aeration, “PB-2” – experimental pile with use of forced aeration, and “PB-3” – no effect control pile. All treatments were carried out with a 1:2 ratio of poultry manure to sawdust. Forced aeration of the mixtures in the experimental piles was carried out by discrete air supply at a rate of 0.35 m³/min, starting from the first day of composting in the 12-hour mode after a 12-hour rest. Throughout the experiment, the temperature of each pile mixture was measured at 10 points at a depth of 50 cm (see Fig. 3). The obtained data on the temperature changes in the piles during composting testify to intensive biological processes in the PB-1 sample related to the development of thermophilic and thermotolerant microorganisms in the consortium.

The physico-chemical and agrochemical parameters of the obtained compost were evaluated for compliance with the normative requirements for organic fertilisers based on animal waste (see Table 3). The content of pathogenic and opportunistic microorganisms, the presence of protozoan cysts and oocysts, as well as helminth eggs and larvae were evaluated to control sanitary and hygienic indicators (see Table 4). Contrary to the control samples, the compost obtained with the participation of the microbial consortium not only complied with the norms as regards the content of organic matter and other nutrients, but was also characterised by elimination of the eimeriosis pathogen together with a reduction in the number of opportunistic microorganisms to the normative level.

Thus, the combined composting of poultry manure and conifer sawdust in the ratio of 1:2, carried out for 46 days at ambient temperatures from +3°C to -15°C, showed a positive effect of the developed consortium on the quality of the obtained compost. The developed consortium can be recommended for composting organic waste in a wide technological corridor of pH values and temperatures.

The article contains 3 Figures, 4 Tables, 30 References.

Keywords: controlled composting, organic waste, bioconversion, microbial consortia, thermophilic and thermotolerant organotrophic microorganisms

Fundings: This work was funded by Innovation Promotion Fund (Agreement No. 48GRSOPR-S7-I5/63638 dated 12/11/2020) and by Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (project No. FSWM-2020-0019).

For citation: Ivashenko DA, Frank Yu.A, Perchenko RV, Rybkin DS, Gerasimchuk AL. Bioconversion of solid livestock waste using a consortium of organotrophic microorganisms: Results of the pilot experiment. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal of Biology*. 2024;66:213-233. doi: 10.17223/19988591/66/11

Введение

Утилизация отходов агропромышленного комплекса (АПК) является одной из основных и нерешенных экологических проблем современности во многих странах мира и связана с неблагоприятным воздействием на экосистемы из-за их неправильного хранения [1, 2]. Современная тенденция развития устойчивого хозяйства и стремления к рециклингу природных ресурсов диктуют необходимость поиска эффективных подходов для управления

отходами АПК. Компостирование рассматривают как один из самых привлекательных способов утилизации широкого спектра органических отходов из-за его экологической безопасности, низкой себестоимости и возможности получения полезных продуктов [3, 4]. Процесс компостирования сводит к минимуму некоторые агрохимические и санитарно-биологические риски, связанные с использованием переработанных органических отходов [1]. Свежие отходы животноводческих комплексов и птицефабрик, несмотря на высокое содержание питательных веществ, не могут быть использованы для растениеводства непосредственно после их образования. Причина в том, что переработанные навозы и пометы при внесении на поля вызывают загрязнение почв, поверхностных и грунтовых вод биогенными элементами и могут быть источниками условно-патогенной микрофлоры, цист простейших, яиц гельминтов и личинок насекомых [5–6].

Другие виды органических отходов также могут быть утилизированы в совместных технологических схемах путем микробной биоконверсии с получением органических удобрений или грунтов. Например, лигнин- и целлюлозосодержащие отходы растениеводства, деревообработки, ландшафтных хозяйств. Они обычно содержат около 40–50% целлюлозы, 25–30% гемицеллюлозы и 15–25% лигнина [7]. Древесина содержит много углерода (около 50%) и сравнительно бедна азотом (0,1–1,2%), поэтому широкое применение одних древесных остатков в качестве удобрения малоэффективно. Для удобрения почвы лучше использовать компосты с включением в их состав конвертированных древесно-растительных остатков [8, 9].

Контролируемое компостирование – это биологический процесс, в котором используются встречающиеся в природе микроорганизмы для преобразования биоразлагаемых органических веществ в гумусоподобный продукт. В процессе компостирования уничтожаются болезнетворные микроорганизмы, происходит превращение азота в формы, доступные для растений, уменьшается объем отходов [1–4]. Процесс лимитируется физико-химическими параметрами (температура, влажность, pH и аэрация) и свойствами субстрата [10]. Баланс питательных веществ определяется прежде всего соотношением углерода и азота в компостной смеси. По литературным данным, оптимальное соотношение C:N находится в пределах от 20:1 до 40:1 [11]. Также важным параметром при компостировании является доступ кислорода, необходимого для эффективной жизнедеятельности аэробных микроорганизмов, осуществляющих превращения органического вещества и соединений азота. Адекватное снабжение кислородом позволяет биологическим процессам развиваться с оптимальной эффективностью. Аэрация также влияет на температуру, влажность, содержание углекислого газа (CO_2) и кислорода (O_2) в воздухе, насыщающем компост, а также на скорость удаления дурно пахнущих и потенциально токсичных газов. Минимальная концентрация кислорода для поддержания аэробных условий составляет 5%. Распространенными способами улучшения аэрации во время контролируемого компостирования являются механическое перемешивание материала и принудительная аэрация посредством системы труб [12].

В настоящее время разработаны и предложены различные методы контролируемого компостирования отходов с использованием приемов, способствующих ускорению созревания компостов; конструкций для улучшения массообмена, поддержания определенной температуры и влажности, подачи кислорода, углекислого газа и т. д. Многие из них основаны на применении дорогостоящих технологических приемов и оборудования, что значительно увеличивает стоимость продукта. Поэтому, наряду с повышением скорости компостирования, очень важным является упрощение процесса получения готового продукта, а также снижение трудозатрат и энергоемкости [13].

Цель настоящего исследования заключалась в выделении и изучении штаммов органотрофных микроорганизмов для ускорения компостирования, разработке микробного консорциума на их основе и проведении промышленных испытаний в ходе совместного компостирования отходов животноводства (на примере птичьего помета) и деревообработки (опилок хвойных пород) в условиях Западной Сибири. В ходе работы также исследовалась необходимость аэрации смеси для успешного компостирования отходов.

Материалы и методы

Отбор органических отходов для целей исследования проводили в январе–феврале 2020 г. непосредственно в местах их образования и накопления. Всего отобрано 3 объединенные пробы отходов на профильных предприятиях в г. Томске и Томском районе: проба PL – куриный помет, помехохранилище птицефабрики «Томская» АО «Сибagro»; проба PM – свиной навоз, навозохранилище свиного комплекса «Томский» АО «Сибagro»; проба CS – сосновые опилки, деревообрабатывающее предприятие, ООО «Томлесдрев». Пробы отбирали стерильными инструментами в одноразовые пластиковые емкости и хранили до анализа и последующего применения при 4°C. Физико-химические и агрохимические показатели органических отходов животноводства и полученных образцов компоста оценивали с точки зрения соответствия требованиям ГОСТ 33830-2016 для органических удобрений на основе отходов животноводства [14]. Комплексный лабораторный анализ проводили в аккредитованной испытательной лаборатории ФГБУ «Станция агрохимической службы «Томская». Для контроля санитарно-гигиенических показателей органических отходов и компоста проводили паразитологические и микробиологические исследования в ОГБУ «Томская областная ветеринарная лаборатория». В ходе исследований оценивалось содержание условно-патогенных и патогенных микроорганизмов, наличие ооцист и цист простейших, а также яиц и личинок гельминтов.

Для культивирования термофильных и термотолерантных гетеротрофных микроорганизмов-деструкторов органического вещества из проб PL и PM были использованы богатые питательные среды в жидкой форме без уплотнения агаром – коммерческий ГРМ-бульон (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия) и жидкий аналог среды Plate Count Agar (PCA), содержащий (г/л): дрожжевой экстракт – 2,50, NaCl – 5,00, D-глюкозу – 1,00, пептон ферментативный – 5,00. Селективным фактором при получении накопительных культур служила температура (50°C).

Для выделения бактерий-продуцентов целлюлаз использовали синтетическую среду с микрокристаллической целлюлозой (МКЦ) следующего состава (г/л): KH_2PO_4 – 0,50, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,25, МКЦ – 2,00.

Жидкие накопительные культуры получали в аэробных условиях с использованием шейкера (180 об/мин). Полученные культуры послужили источниками для выделения чистых культур штаммов-продуцентов для биоконверсии отходов в составе промышленных консорциумов. Чистые культуры микроорганизмов-деструкторов органического вещества и целлюлолитических микроорганизмов выделяли методом Коха (изолированием отдельно лежащей колонии) на соответствующих плотных питательных средах. Для изучения морфологии клеток применяли метод фазово-контрастного микроскопирования («Биомед 6», Россия) с использованием объектива $\times 100$ и программного обеспечения Tour Tek TourView, Версия X86.

Идентификацию микроорганизмов и биоинформационный анализ проводили с помощью анализа последовательностей гена 16S рРНК, близких к полным [15]. Тотальная ДНК из колоний была выделена с использованием модифицированного фенол-хлороформного метода [16] с обработкой СТАВ. Для этого около 100 мг биомассы смешивали с 490 мкл ТЕ-буфера (рН 8,0), 15 мкл 20% SDS, протеиназой К, лизоцимом, аккуратно перемешивали и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Вносили 100 мкл 5M NaCl, перемешивали, добавляли 160 мкл СТАВ/NaCl и инкубировали при 65°C в течение 15 мин. Вносили равный объем хлороформа, перемешивали и центрифугировали 5–7 мин при 12 000 об/мин, супернатант смешивали со смесью фенол:хлороформ:изоамиловый спирт (25:24:1), центрифугировали в течение 5 мин при 12 000 об/мин. ДНК осаждали из супернатанта холодным изопропанолом в количестве $0,7\times$ от объема (мкл) с добавлением 35 мкл 3M ацетата натрия. Далее нити ДНК собирали в течение 10 мин при 14 000 об/мин. Осадок дважды промывали в 500 мкл охлажденного 70% этанола в течение 1 мин при 1 400 об/мин. Финальную промывку проводили 100% охлажденным этанолом. Осадок просушивали при 40°C в течение 10–15 мин в твердотельном термостате. Полученную ДНК растворяли в 100 мкл ТЕ буфера. Для амплификации последовательности гена 16S рРНК бактерий использовали праймеры 27F (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) и 1492R (5' GGTTACCTTGTTACGACTT). Состав ПЦР смеси соответствовал рекомендуемому для Taq-полимеразы (#EP0402, Thermo Scientific). Продукты амплификации разделяли в 1% агарозном геле в смеси с интеркалирующим красителем SYBRGreen (1:5 мкл) при 110 V в течение 25 мин и визуализировали на трансиллюминаторе. Секвенирование проводили в ЗАО «Синтол» (г. Москва) автоматизированным методом Сэнгера с предварительной ферментативной очисткой продуктов ПЦР. Из отдельных последовательностей ДНК были получены консенсусные последовательности максимально возможной длины в приложении BioEdit [15]. Для анализа консенсусных последовательностей была использована база данных GenBank NCBI. Близкие к полным последовательности 16S рРНК выделенных и идентифицированных штаммов депонированы в базу данных GenBank NCBI под номерами PP572911–PP572917.

При отборе штаммов для консорциума на основе данных биоинформационного анализа и культуральных свойств учитывали филогенетическое положение и отсутствие патогенных свойств, а также принимали во внимание наличие способности к деградации органических веществ, включая труднорастворимые полимеры и общие физиологические свойства, которые обуславливают биотехнологический потенциал органотрофов для биоконверсии отходов.

Опытную партию консорциума для испытаний получали в ферментере «Ф-200» (Китай) на цитратно-аммонийной среде следующего состава, г/л: натрий лимоннокислый 3-замещенный – 2,0, хлорид натрия – 5,0, сульфат магния 7-водный – 0,2, гидрофосфат аммония – 1,0, дигидрофосфат калия – 1,0, сахароза – 1,0, масло растительное в качестве пеногасителя – 10,0. Опытно-промышленные испытания технологии компостирования птичьего помета птицефабрики «Томская» проводили в октябре–ноябре 2021 г. в течение ~6 нед на производственной площадке ООО «Дарвин», г. Томск. В ходе работ тестировали разработанный консорциум для совместного компостирования отходов животноводства (помет) и деревообработки (опилок хвойных пород). Компостирование сырья проводили в буртах. Общее число буртов составило 3, каждый из них имел габариты 3×3×2 м, объем 18 м³. Были заложены следующие варианты буртов: ПБ-1 – экспериментальный бурт с внесением консорциума и использованием принудительной аэрации; ПБ-2 – экспериментальный бурт с использованием принудительной аэрации; ПБ-3 – контроль без воздействий. Все варианты были заложены при соблюдении пропорций птичьего помета и опилок 1:2. Данное соотношение компонентов попадает в зону оптимального соотношения C:N на основе расчетов с учетом насыпной плотности отходов. Принудительную аэрацию смесей в буртах проводили с помощью дискретной подачи воздуха со скоростью 0,35 м³/мин, начиная с первых суток компостирования в режиме 12 ч через 12 ч в ходе всего технического процесса.

На протяжении всего эксперимента проводили измерения температуры каждого бурта в 10 точках на глубине 50 см. Статистическая обработка данных температурных измерений проведена с применением непараметрического U-критерия Манна–Уитни путем сравнения средних значений на основе не менее 10 индивидуальных замеров в каждой временной точке, полученных для каждого варианта эксперимента. Отличия считали значимыми при $p < 0,01$. На графике представлены средние арифметические значения полученных показателей со стандартным отклонением.

Результаты исследования и обсуждение

Процесс компостирования может быть как аэробным (с потреблением кислорода), так и анаэробным, однако аэробный вариант компостирования гораздо более быстрый и более эффективный с точки зрения нейтрализации неприятного запаха и получения качественного готового продукта [17]. Поэтому исследование было сосредоточено на выделении и тестировании аэробных продуцентов для промышленного применения.

Полученные из куриного помета и свиного навоза накопительные культуры послужили источниками для выделения штаммов-продуцентов для биоконверсии отходов в составе промышленных консорциумов. Всего из отходов животноводства выделено 7 чистых культур органотрофных бактерий. Все устойчиво растущие в чистых культурах штаммы термофильных и термотолерантных бактерий были представлены палочковидными клетками. Большинство представлено грамположительными спорообразующими формами (рис. 1).

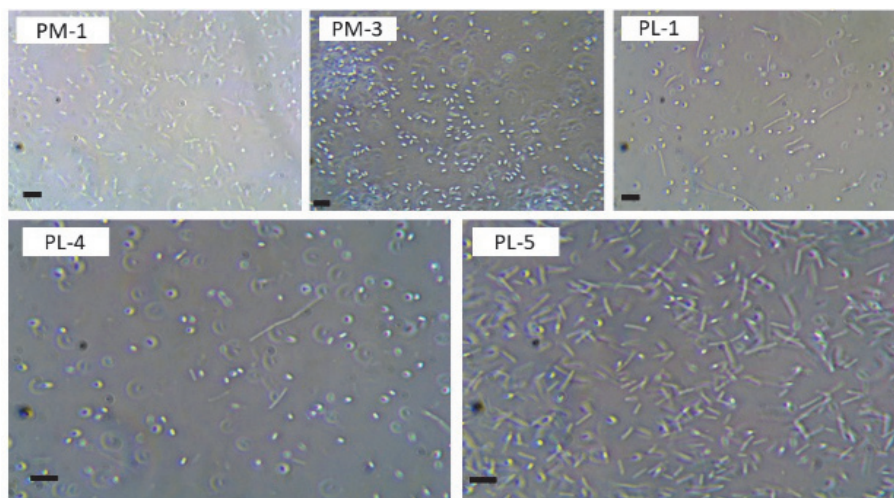


Рис. 1. Клетки и споры штаммов органотрофных бактерий, выделенных из отходов животноводства, фазово-контрастная микроскопия, линейка 5 мкм
[Fig. 1. Cells and spores of organotrophic bacteria isolated from livestock waste, phase-contrast microscopy, scale bar is 5µm]

Из бактерий, полученных на среде с МКЦ при 50°C, стабильный рост в культуре показал лишь один штамм – РМ-cell из свиного навоза. На плотной среде с добавлением МКЦ в качестве единственного источника углерода и электронов штамм РМ-cell образует прозрачные слизистые колонии неправильной формы с неровным краем. Клетки представляют собой короткие мелкие палочки с закругленными концами, 0,5–0,7×1,0–1,5 мкм (рис. 2, а). Клетки неподвижные, не образуют спор, по Граму окрашиваются отрицательно. Штамм разлагает целлюлозу, что подтверждает качественный тест на минеральной питательной среде с фильтровальной бумагой (рис. 2, б).

Штаммы бактерий, выделенные из птичьего помета, относились к семействам *Raenibacillaceae* и *Bacillaceae* внутри филума *Bacillota* (табл. 1). Бактерии, выделенные из пробы куриного помета, близкородственны *Bacillus amyloliquefaciens* (штамм PL-1, 100% гомологии последовательности), *Bacillus subtilis* (PL-4, 99,93%) и *Aneurinibacillus thermoaerophilus* (PL-5, 99,93%). Бактерии данных групп, включающих термофильных и термотолерантных представителей, являются органотрофами и могут быть использованы для биоконверсии органического вещества в ходе компостирования.

Интересно, что нам удалось выделить термотолерантного представителя, близкого к *B. subtilis*, что встречается довольно редко, но такие представители могут иметь полезные свойства, как, например, штамм, выделенный ранее из коровьего навоза [18].

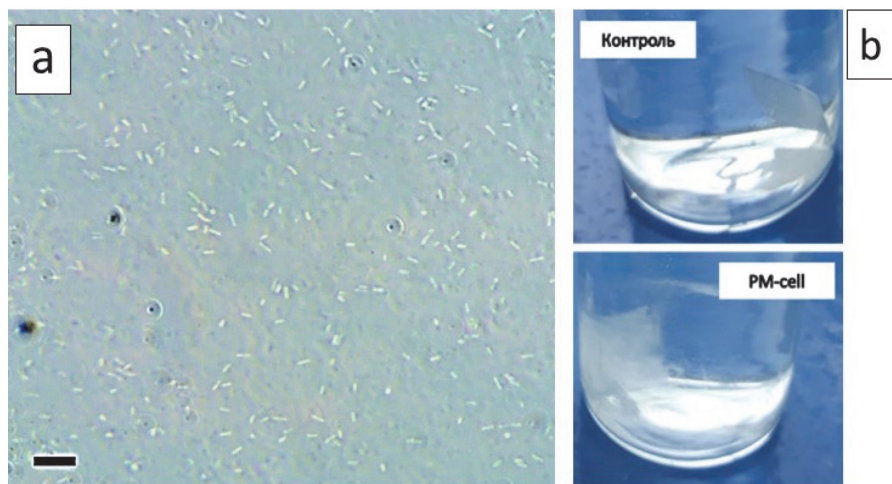


Рис. 2. Клетки штамма PM-cell на агаризованной среде с МКЦ:

а – фазово-контрастная микроскопия, линейка 5 мкм;

б – результаты качественного теста на разрушение целлюлозы

[Fig. 2. PM-cell strain cells on agar medium with MCC, a - Phase-contrast microscopy, scale bar is 5 μ m, b - Results of a qualitative test for cellulose destruction]

Таблица 1 [Table 1]

Результаты идентификации штаммов бактерий из органических отходов на основании анализа последовательности гена 16S рРНК

[Data on identification of bacterial strains from organic waste based on analysis of the 16S rRNA gene sequence]

Штамм [Strain]	Филогенетическая принадлежность [Phylogenetic affiliation]	Ближайший валидно описанный родственник [Closest validly described relative]	Номер доступа GenBank NCBI [GenBank NCBI accession number]	% сходства (количество совпавших нуклеотидов) [% similarity (number of matched nucleotides)]
Источник выделения: птичий помет PL [Source of isolation: poultry manure PL]				
PL-1	Bacteria; Bacillota; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; <i>Bacillus</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> SN-15	KR010172	100 (1453 / 1453)
PL-4	Bacteria; Bacillota; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; <i>Bacillus</i>	<i>Bacillus subtilis</i> BRU16-Sr	MT645257	99,93 (1451 / 1452)
PL-5	Bacteria; Bacillota; Bacilli; Bacillales; Paenibacillaceae; <i>Aneurinibacillus</i>	<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i> DSM 10154	NR_112216	99,93 (1444 / 1445)

Штамм [Strain]	Филогенетическая принадлежность [Phylogenetic affiliation]	Ближайший валидно описан- ный родственник [Closest validly described relative]	Номер до- ступа Gen- Bank NCBI [GenBank NCBI accession number]	% сходства (количество совпавших нуклеотидов) [% similarity (number of matched nucleotides)]
Источник выделения: свиной навоз, PM [Source of isolation: swine manure PM]				
PM-cell	Bacteria; Pseudomonad- ota; Gammaproteobacte- ria; Xanthomonadales; Xanthomonadaceae; <i>Pseudoxanthomonas</i>	<i>Pseudoxanthomonas</i> <i>taiwanensis</i> штамм NBRC 101072	NR_113974	100 (1443 / 1443)
PM-1	Bacteria; Bacillota; Bacilli; Bacillales; Paenibacillaceae; <i>Aneurinibacillus</i>	<i>Aneurinibacillus</i> <i>thermoaerophilus</i> SSA4	MH988755	100 (1444 / 1444)
PM-2	Bacteria; Bacillota; Bacilli; Bacillales; Paenibacillaceae; <i>Brevibacillus</i>	<i>Brevibacillus brevis</i> BEA1	EF079071	99,93 (1428 / 1429)
PM-3	Bacteria; Bacillota; Bacilli; Bacillales; Paenibacillaceae; <i>Brevibacillus</i>	<i>Brevibacillus brevis</i> BEA1	EF079071	99,93 (1450 / 1451)

Штаммы PM-1, PM-2 и PM-3 из свиного навоза также идентифицированы как принадлежащие к Bacillota (семейство Paenibacillaceae). Штамм PM-1 на основании анализа последовательности, кодирующей ген 16S рРНК, отнесен к виду *A. thermoaerophilus*, который включает термофильные органотрофные бактерии. Штаммы PM-2 и PM-3 близкородственны (99,93%) штамму *Brevibacillus brevis* BEA1, выделенному из вермикомпоста из отходов производства оливкового масла [19], и также имеют потенциал для применения в составе промышленных консорциумов для компостирования органических отходов. PM-cell относится к *Pseudoxanthomonas taiwanensis*, типовой штамм которого выделен и описан из горячего источника на Тайване [20].

Так как сравнительный анализ маркерных последовательностей ДНК позволил определить видовую принадлежность выделенных микроорганизмов, анализ литературных источников позволил исключить присутствие среди них потенциально патогенных для растений и животных.

При отборе штаммов, которые могут быть включены в состав консорциума, принимали во внимание наличие у ближайших родственников способности к деградации органических веществ, включая трудноразлагаемые полимеры и общие физиологические свойства, которые обуславливают биотехнологический потенциал органотрофов для биоконверсии отходов. Также отбраковали повторяющиеся штаммы, идентичные по последовательности гена 16S рРНК. В результате был разработан консорциум, предназначенный для компостирования органических отходов животноводства,

перерабатывающей и пищевой промышленности, включающий следующие штаммы:

1. *B. amyloliquefaciens* PL-1 – термотолерантный аэробный органотроф с диапазоном температур от 15 до 60°C, оптимумом при 37°C [21, 22]. Способен к образованию спор. Оптимально растет при pH 5,0–7,0, более слабый рост отмечается при низких значениях pH 4,5. Штамм PL-1 также представляет ценность как продуцент альфа-амилазы и протеаз, так как эти свойства характерны для всех представителей вида *Bacillus amyloliquefaciens* [21].

2. *A. thermoaerophilus* (ранее *Bacillus thermoaerophilus*) PL-5 – термофильный аэробный деструктор органического вещества с оптимумом для роста при 50–55°C, максимальная температура для деления клеток достигает 65°C, не растет при температуре ниже 35–37°C [23]. Устойчив к высоким значениям pH. Способен к образованию эндоспор. Представители *A. thermoaerophilus* хорошо известны как продуценты липаз [24], щелочных целлюлаз [25] и других гидролитических ферментов [26], что делает штамм PL-5 ценным с точки зрения применения в биотехнологиях компостирования отходов.

3. *B. brevis* PM-3 – термотолерантный органотроф с температурным диапазоном для роста от 15 до 55°C и оптимумом при 37°C [27]. Способен к образованию эндоспор. Все известные штаммы *Brevibacillus brevis* гидролизуют казеин и желатин, организм устойчив к высоким значениям pH (до 9,0).

4. *P. taiwanensis* PM-cell – термофильный аэробный сахаролитик. Рост возможен при температуре от 30 до 60°C, оптимум 50°C [20]. Диапазон pH от 6,0 до 11,0, оптимально растет при pH 8,0. Данный микроорганизм продуцирует во внешнюю среду β-глюкозидазу – гидролитический фермент, расщепляющий β-гликозидные связи полисахаридов (в частности, целлюлозы). Биопрепараты, содержащие *P. taiwanensis* PM-cell, могут использоваться для разложения полисахаридов, в том числе в условиях высоких температур.

Помимо перечисленных, в состав консорциума вошел выделенный нами ранее из активного ила городских очистных сооружений штамм *Anoxybacillus kamchatkensis* AS-GOS-2. Это термофильная органотрофная бактерия, имеет диапазон температур для роста 38–67°C с оптимумом при 57–62°C, диапазон pH 5,7–9,9 с оптимумом 6,8–8,5 [28]. Клетки способны к образованию эндоспор. Главным образом, микроорганизм утилизирует сахара, включая полисахариды (пектин и крахмал) в аэробных условиях [29, 30].

Физико-химические условия для применения разработанного консорциума представлены в табл. 2.

Для промышленного применения штаммы бактерий культивировали индивидуально во избежание сукцессии отдельных микроорганизмов и формирования неравновесного сообщества и лишь на последнем этапе жидкие культуры каждого штамма объединяли для получения опытной партии биопрепарата. Далее проводили тестирование разработанного консорциума универсального назначения для совместного компостирования отходов животноводства (куриного помета) и деревообработки (опилок хвойных пород).

Таблица 2 [Table 2]

**Тепловая карта, характеризующая технологический коридор
для применения штаммов, вошедших в состав консорциума**
[Heatmap showing the technological corridor for the use of the strains in the consortium]

		Температура, °C [Temperature, °C]				
		4–15	15–30	30–45	45–60	60–75
11	<i>A. kamchatkensis</i> AS-GOS-2					
22	<i>B. amyloliquefaciens</i> PL-1					
33	<i>A. thermoaerophilus</i> PL-5					
44	<i>B. brevis</i> PM-3					
55	<i>P. taiwanensis</i> PM-cell					
		4,0–5,0	5,0–6,0	6,0–7,0	7,0–8,0	8,0–9,0
		pH, ед. pH [pH, units pH]				

Примечание. Верхний ряд ячеек для каждого штамма характеризует температурную устойчивость, нижний – устойчивость к pH. Интенсивность заливки ячеек отражает устойчивость к данному диапазону температуры и pH (чем темнее, тем выше устойчивость).

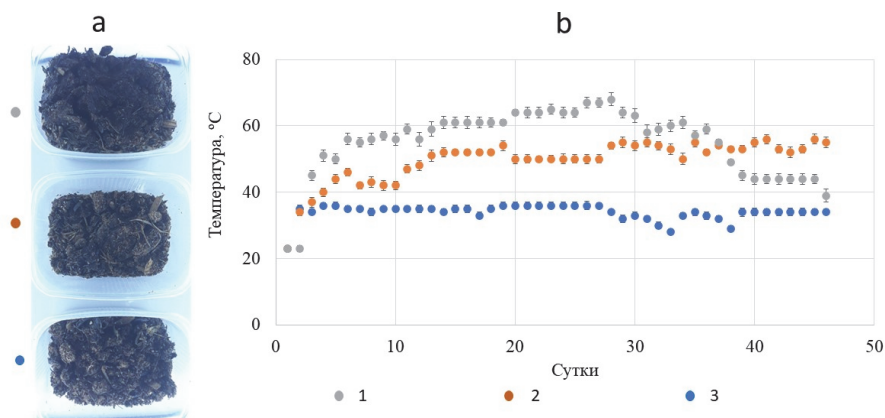
[Note. The top row of cells for each strain characterises temperature resistance, the bottom row pH resistance. The intensity of the cell filling reflects the resistance to a given range of temperature and pH (the darker the cell, the higher the resistance)].

На рис. 3, *b* показаны температурные кривые смеси в буртах с принудительной аэрацией без применения консорциума микроорганизмов (ПБ-2), с принудительной аэрацией и с применением консорциума микроорганизмов (ПБ-1) по сравнению с интактным контролем (ПБ-3). Средняя температура смеси за период экспозиции в контрольном бурте ПБ-3 (34°C) была значимо ниже ($p < 0,01$) по сравнению с экспериментальными буртами ПБ-2 и ПБ-1 со средними значениями 49 и 55°C соответственно. Сравнительный анализ температурных кривых в буртах ПБ-2 и ПБ-3 с применением критерия Манна–Уитни показал, что температура смеси в бурте с внесением микробного консорциума (ПБ-1) была более высокой ($p < 0,01$). Полученные данные об изменениях температуры в буртах в ходе компостирования свидетельствуют об интенсивных биологических процессах в пробе ПБ-1, связанных с развитием термофильных и термотолерантных микроорганизмов в составе использованного консорциума.

После экспозиции в течение 46 суток были получены экспериментальные образцы биокомпоста на основе органических отходов животноводства (птичьего помета) и сосновых опилок (рис. 3, *a*).

Результаты лабораторного анализа физико-химических и агрохимических параметров образцов компоста из отходов животноводства (птичьего помета) и отходов деревообработки представлены в табл. 3. Физико-химические и агрохимические показатели полученного компоста, как и исходное

сырье в виде отходов, оценивали на соответствие требованиям ГОСТ 33830-2016 для органических удобрений на основе отходов животноводства.



1 – Аэрация + консорциум, среднее значение температуры $55,0 \pm 10,3^{\circ}\text{C}$ [Aeration + consortium, average temperature $55.0 \pm 10.3^{\circ}\text{C}$]
 2 – Аэрация, среднее значение температуры $49,5 \pm 6,5^{\circ}\text{C}$ [Aeration, average temperature $49.5 \pm 6.5^{\circ}\text{C}$]
 3 – Контроль, среднее значение температуры $33,9 \pm 2,4^{\circ}\text{C}$ [Control, average temperature $33.9 \pm 2.4^{\circ}\text{C}$]
 On the X-axis - Day; on the Y-axis - Temperature, $^{\circ}\text{C}$

Рис. 3. Результаты эксперимента по компостированию: а – внешний вид экспериментальных образцов компоста на основе птичьего помета и хвойных опилок; б – температурные кривые буртов с разными условиями компостирования по сравнению с интактным контролем. В каждой точке показана средняя температура бурта на глубине 50 см по результатам 10 измерений $\pm$ стандартное отклонение

[Fig. 3. Composting experiment results: a - Appearance of experimental samples of compost based on bird droppings and pine sawdust, b - Temperature curves of piles with different composting conditions compared to intact control. Each point shows the average temperature of the pile at a depth of 50 cm, based on the results of 10 measurements $\pm$ standard deviation]

После компостирования влажность во всех полученных экспериментальных образцах была в пределах нормы ($< 75\%$), содержание органического вещества соответствовало требованиям ГОСТ 33830-2016 [14], составляя не менее 50% (табл. 3). Содержание питательных элементов для растений (N, P, K) удовлетворяло нормативным требованиям во всех образцах. Единственным агрохимическим показателем, превышающим норму, оказался уровень pH (от 8,9 до 9,1 при нормативном значении от 6,5 до 8,5 ед.), который нуждается в коррекции. Для получения в данных условиях компоста, соответствующего требованиям по pH (до 8,5) необходимо продлить срок стабилизации продукта на 2–4 нед. По показателям, характеризующим радиоактивность субстрата, отклонений от нормативных значений в образцах компоста не обнаружено – удельная активность радионуклидов была в норме во всех исследованных пробах (см. табл. 3). Показатели содержания токсичных металлов в компосте также полностью соответствовали требованиям ГОСТ 33830-2016.

В экспериментальном образце биокомпоста ПБ-1, полученном в ходе компостирования органических отходов в присутствии консорциума термо-

фильных и термотолерантных микроорганизмов и с принудительной аэрацией, не обнаружено цист кишечных патогенных простейших, жизнеспособных яиц и личинок гельминтов, патогенных и болезнетворных микроорганизмов (табл. 4).

Таблица 3 [Table 3]

**Результаты лабораторных испытаний сырья
и экспериментальных образцов компоста**
[Results of laboratory analysis of raw materials and experimental compost samples]

Наименование показателя [Index name]	Единицы измерения [Units]	Сырьё [Raw materials]		Экспериментальные образцы компоста [Experimental compost samples]			Норматив ГОСТ 33830-2016 [Standard GOST 33830-2016]
		Птичий помет PL [Poultry manure PL]	Опилки хвойные [Pine sawdust]	ПБ-1 [PB-1]	ПБ-2 [PB-2]	ПБ-3 [PB-3]	
pH [pH]	ед. pH [units pH]	5,00 ± 0,10	—	9,00	9,10	8,90	6,00–8,50
Массовая доля влаги [Mass fraction of moisture]	%	78,70 ± 0,9	—	55,30 ± 0,80	61,00 ± 0,80	62,40 ± 0,80	< 75,00
Массовая доля сухого вещества [Mass fraction of dry matter]	%	—	39,20 ± 2,00	—	—	—	> 25,00
Зольность [Ash content]	%	13,60 ± 1,50	0,6 ± 0,1	—	—	—	—
Массовая доля органического вещества в пересчете на С [Mass fraction of organic matter in terms of C]	%	—	49,7 ± 0,8	35,5 ± 1,2	42,5 ± 0,8	34,30 ± 1,20	—
Массовая доля органического вещества [Mass fraction of organic matter]	%	86,40	99,40	71,00	85,00	68,60	> 50,00
Массовая доля в сухом веществе [Mass fraction in dry matter]							
Общего азота (N) [Total nitrogen (N)]	%	4,05 ± 0,30	0,49 ± 0,07	4,50 ± 0,30	5,34 ± 0,30	4,69 ± 0,30	> 0,70
Аммонийного азота [Ammonium nitrogen]	%	0,05 ± 0,03	—	1,97 ± 0,20	2,36 ± 0,20	1,01 ± 0,10	—
Общего фосфора (P ₂ O ₅)	%	2,32 ± 0,20	0,06 ± 0,02	3,00 ± 0,20	3,40 ± 0,20	2,70 ± 0,20	> 0,50

Наименование показателя [Index name]	Единицы измерения [Units]	Сырьё [Raw materials]		Экспериментальные образцы компоста [Experimental compost samples]			Норматив ГОСТ 33830-2016 [Standard GOST 33830-2016]
		Птичий помет PL [Poultry manure PL]	Опилки хвойные [Pine sawdust]	ПБ-1 [PB-1]	ПБ-2 [PB-2]	ПБ-3 [PB-3]	
[Total phosphorus (P ₂ O ₅)]							
Общего калия (K ₂ O) [Total potassium (K ₂ O)]	%	2,15 ± 0,10	0,09 ± 0,02	1,70 ± 0,10	2,10 ± 0,10	0,70 ± 0,05	> 0,30
Металлы и мышьяк (валовая форма) [Metals and arsenic (bulk form)]							
Ртуть [Mercury]	мг/кг [mg/kg]	< 0,20	–	< 0,20	< 0,20	< 0,20	< 2,10
Мышьяк [Arsenic]	мг/кг [mg/kg]	< 0,20	–	0,40 ± 0,10	0,30 ± 0,10	0,90 ± 0,10	< 10,00
Кадмий [Cadmium]	мг/кг [mg/kg]	0,36 ± 0,04	0,19 ± 0,07	0,20 ± 0,07	0,24 ± 0,08	0,52 ± 0,18	< 2,00
Свинец [Lead]	мг/кг [mg/kg]	0,23 ± 0,05	1,68 ± 0,59	2,10 ± 0,74	1,32 ± 0,46	5,79 ± 2,01	< 130,00
Радионуклиды (удельная активность) [Radionuclides (specific activity)]							
Цезий-137 [Cesium-137]	Бк/кг [Bq/kg]	< 2,00	–	< 2,00	2,98 ± 7,72	< 2	300,00
Стронций-90 [Strontium-90]	Бк/кг [Bq/kg]	0,00	–	< 0,20	< 0,20	< 0,20	300,00
ЕРН [Natural radionuclides]	Бк/кг [Bq/kg]	–	–	–	59,85	–	–

Примечание. «–» – не определяли.

[Note. «–» - Not determined].

В образце ПБ-2, полученном с применением азрации, но без внесения консорциума микроорганизмов, сохранились возбудители эймериоза, которые изначально детектированы в птичьем помете. Таким образом, в результате применения компостирования птичьего помета удалось снизить содержание условно-патогенной микрофлоры. Во всех образцах после компостирования численность энтерококков соответствовала нормативному значению ГОСТ 33830-2016 (табл. 4). Численность бактерий группы кишечной палочки (колиформных бактерий) была снижена по сравнению с характеристиками исходного сырья, однако по окончании эксперимента соответствовала нормативу только в образце ПБ-1, полученному с применением консорциума с азрацией и прошедшему более интенсивную термообработку в ходе компостирования.

Таким образом, при использованном соотношении птичьего помета и опилок 1:2 компост, соответствующий нормативным требованиям ГОСТ 33830-2016 по санитарно-микробиологическим и паразитологическим показателям, был получен только при применении микробного консорциума и

принудительной аэрации. Устранение возбудителя эймериоза в совокупности со снижением численности условно-патогенной микрофлоры до нормируемого уровня стало возможным за счет устойчивого повышения температуры смеси до уровня выше 60°C.

Таблица 4 [Table 4]

Результаты санитарно-микробиологического и паразитологического анализа сырья и экспериментальных образцов биокомпоста
[Results of hygienic-microbiological and parasitological analyses of raw materials and compost samples]

Наименование показателя [Index name]	Ед. измер. [Units]	Сырьё [Raw materials]	Экспериментальные образцы компоста [Experimental compost samples]			Норматив ГОСТ 33830-2016 [Standard GOST 33830-2016]
		Птичий помет PL [Poultry manure PL]	ПБ-1 [PB-1]	ПБ-2 [PB-2]	ПБ-3 [PB-3]	
Цисты кишечных патогенных простейших [Cysts of intestinal pathogenic protozoa]	—	Возбудитель эймериоза [Causative agent of eimeriosis]	Н/о	Возбудитель эймериоза [Causative agent of eimeriosis]	Н/о [N/f]	Не допускается [Not allowed]
Наличие жизнеспособных яиц и личинок гельминтов [Presence of viable helminth eggs and larvae]	—	Н/о [N/f]	Н/о [N/f]	Н/о [N/f]	Н/о [N/f]	Не допускается [Not allowed]
Наличие патогенных и болезнетворных микроорганизмов [Presence of pathogenic microorganisms]	кл/г [cells/g]	Н/о [N/f]	Н/о [N/f]	Н/о [N/f]	Н/о [N/f]	Не допускается [Not allowed]
Колиформные бактерии [Coliform bacteria]	кл/г [cells/g]	10 ⁶	< 1	10	10 ²	1–9
Энтерококки [Enterococci]	кл/г [cells/g]	10 ⁶	< 1	< 1	< 1	1–9

Примечание. «Н/о» – не обнаружено; «–» – не определяли.

[Note. «N/f» - not found; «–» - Not determined].

Заключение

Образцы отходов послужили источником для получения термофильных и термотолерантных органотрофных микроорганизмов, в том числе продуцентов липолитических, целлюлолитических и лигнолитических ферментов. Молекулярно-генетические исследования позволили идентифицировать изоляты и отобрать непатогенные формы для включения в состав промышленного консорциума. Данные биоинформационного анализа также послужили основой для оценки метаболического потенциала выделенных микроорганизмов.

На основе выделенных непатогенных штаммов микроорганизмов-продуцентов разработан консорциум для компостирования отходов животноводства и деревообработки с получением органических удобрений, включающий штаммы *Anoxybacillus kamchatkensis* AS-GOS-2 (термофильный органотроф, деструктор органического вещества), *Bacillus amyloliquefaciens* PL-1 (термотолерантный органотроф и продуцент гидролитических ферментов), *Aneurinibacillus thermoaerophilus* PL-5 (термофильный органотроф и продуцент гидролитических ферментов), *Brevibacillus brevis* PM-3 (термотолерантный органотроф, продуцент протеолитических ферментов), *Pseudoxanthomonas taiwanensis* PM-cell (термофильный сахаролитик, продуцент целлюлолитических ферментов).

Полученные контрольные и экспериментальные образцы биокомпоста на основе отходов животноводства в сочетании с отходами деревообработки продемонстрировали положительное влияние разработанного консорциума на процесс компостирования. В отличие от контрольных образцов, биокомпост, полученный с участием консорциума, соответствовал нормативам ГОСТа не только в отношении содержания органического вещества и других питательных веществ, но также характеризовался устранением возбудителя эймериоза в совокупности со снижением численности условно-патогенной микрофлоры до нормируемого уровня.

Список источников

1. Chilakamarry C.R., Sakinah A.M., Zularisam A., Sirohi R., Khilji I.A., Ahmad N., Pandey A. Advances in solid-state fermentation for bioconversion of agricultural wastes to value-added products: Opportunities and challenges // *Bioresource Technology*. 2022. Vol. 343. PP. 126065. doi: 10.1016/j.biortech.2021.126065
2. Awogbemi O., Von Kallon D.V. Pretreatment techniques for agricultural waste // *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering*. 2022. Vol. 6. PP. 100229. doi: 10.1016/j.cscee.2022.100229
3. Tahseen S., Basheer-Salimia R., Hawamde F., Sánchez A. Recycling of organic wastes through composting: process performance and compost application in agriculture // *Agronomy*. 2020. Vol. 10, № 11. PP. 1838. doi: 10.3390/agronomy10111838
4. Becker S.J., Ebrahimzadeh A., Plaza Herrada B.M., Lao M.T. Characterization of compost based on crop residues: changes in some chemical and physical properties of the soil after applying the compost as organic // *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. 2010. Vol. 41, № 6. PP. 696–708. doi: 10.1080/00103620903563931
5. Muhammad J., Khan S., Lei M., Khan M.A., Nawab J., Rashid A., Ullah S., Khisro S.B. Application of poultry manure in agriculture fields leads to food plant contamination with potentially toxic elements and causes health risk // *Environmental Technology & Innovation*. 2020. Vol. 19. PP. 100909. doi: 10.1016/j.eti.2020.100909
6. Rayne N., Lawrence A. Livestock manure and the impacts on soil health: a review // *Soil Systems*. 2020. Vol. 4, № 4. PP. 64. doi: 10.3390/soilsystems4040064
7. Isikgora F.H., Remzi Becer C. Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers // *Polymer Chemistry*. 2015. Vol. 6. PP. 4497–4559. doi: 10.1039/C5PY00263J
8. Kuba T., Tschöll A., Partl C., Meyer K., Insam H. Wood ash admixture to organic wastes improves compost and its performance // *Agriculture, Ecosystems & Environment*. 2008. Vol. 127, № 1–2. PP. 43–49. doi: 10.1016/j.agee.2008.02.012
9. Huang G.F., Wu Q.T., Wong J.W.C., Nagar B.B. Transformation of organic matter during co-composting of pig manure with sawdust // *Bioresource Technology*. 2006. Vol. 97, № 15. PP. 1834–1842. doi: 10.1016/j.biortech.2005.08.024

10. Peirce J.J., Weiner R.F., Vesilind P.A. Chapter 14 - Reuse, Recycling, and Recovery // Environmental Pollution and Control, 4th edn. Butterworth-Heinemann, 1998. PP. 177–191.
11. Kulikowska D., Gusiati Z.M. Sewage sludge composting in a two-stage system: Carbon and nitrogen transformations and potential ecological risk assessment // Waste Management. 2015. Vol. 38. PP. 312–320. doi: 10.1016/j.wasman.2014.12.019
12. Ogunwande G.A., Osunade J.A. Passive aeration composting of chicken litter: effects of aeration pipe orientation and perforation size on losses of compost elements // Journal of Environmental Management. 2011. Vol. 92. PP. 85–91. doi: 10.1016/j.jenvman.2010.08.026
13. Azim K., Soudi B., Boukhari S., Perissol C., Roussos S., Thami Alami I. Composting parameters and compost quality: a literature review // Organic Agriculture. 2018. Vol. 8. PP. 141–158. doi: 10.1007/s13165-017-0180-z
14. ГОСТ 33830-2016. Удобрения органические на основе отходов животноводства. Технические условия. М. : Стандартинформ, 2020.
15. Gerasimchuk A.L., Ivasenko D.A., Bukhtiyarova P.A., Antsiferov D.V., Frank Y.A. Search for new cultured lipophilic bacteria in industrial fat-containing wastes // BIO Web of Conferences. II International Scientific Conference “Plants and Microbes: The Future of Biotechnology” (PLAMIC2020). 2020. Vol. 23. PP. 002012. doi: 10.1051/bioconf/20202302012
16. Möller E.M., Bahnweg G., Sandermann H., Geiger H.H. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues // Nucleic Acids Research. 1992. Vol. 20, № 22. PP. 6115–6116. doi: 10.1093/nar/20.22.6115
17. Devi S., Sharma C.R., Singh K. Microbiological biodiversity in poultry and paddy straw wastes in composting systems // Brazilian Journal of Microbiology. 2012. Vol. 43. PP. 288–296. doi: 10.1590/S1517-838220120001000034
18. Swain M.R., Laxminarayana K., Ray R.C. Phosphorus solubilization by thermotolerant *Bacillus subtilis* isolated from cow dung microflora // Agricultural Research. 2012. Vol. 1, № 3. PP. 273–279. doi: 10.1007/s40003-012-0022-x
19. Moreno B., Vivas A., Nogales R., Benitez E. Solvent tolerance acquired by *Brevibacillus brevis* during an olive-waste vermicomposting process // Ecotoxicology and Environmental Safety. 2009. Vol. 72, № 8. PP. 2109–2114. doi: 10.1016/j.ecoenv.2009.06.011
20. Chen M.Y., Tsay S.S., Chen K.Y., Shi Y.C., Lin Y.T., Lin G.H. *Pseudoxanthomonas taiwanensis* sp. nov., a novel thermophilic, N₂O-producing species isolated from hot springs // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2002. Vol. 52, № 6. PP. 2155–2161. doi: 10.1099/00207713-52-6-2141
21. Priest F., Goodfellow M., Shute L.A., Berkeley R. *Bacillus amyloliquefaciens* sp. nov. norn. rev. // International Journal of Systematic Bacteriology. 1987. Vol. 37. PP. 69–71.
22. Gotor-Vila A., Teixidó N., Sisquella M., Torres R., Usall J. Biological characterization of the biocontrol agent *Bacillus amyloliquefaciens* CPA-8: The effect of temperature, pH and water activity on growth, susceptibility to antibiotics and detection of enterotoxigenic genes // Current Microbiology. 2017. Vol. 74, № 9. PP. 1089–1099. doi: 10.1007/s00284-017-1289-8
23. Meier-Staufffer K., Busse H., Rainey F., Burghardt J., Scheberl A., Hollaus L.F., Kuen B., Makristathis A., Sleytr U., & Paulmeyer I. Description of *Bacillus thermoaerophilus* sp. nov., to include sugar beet isolates and *Bacillus brevis* ATCC 12990 T // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 1996. Vol. 46. PP. 532–541.
24. Zottig X., Meddeb-Mouelhi F., Charbonneau D.M., Beauregard M. Characterization of a novel alkalophilic lipase from *Aneurinibacillus thermoaerophilus*: lid heterogeneity and assignment to family I.5 // The Protein Journal. 2017. Vol. 36. PP. 478–488. doi: 10.1007/s10930-017-9743-9
25. Acharya S., Chaudhary A. Alkaline cellulase produced by a newly isolated thermophilic *Aneurinibacillus thermoaerophilus* WBS2 from hot spring, India // African Journal of Microbiology Research. 2012. Vol. 6. PP. 5453–5458. doi: 10.5897/AJMR11.1491
26. Kamli M.R., Alzahrani N.A.Y., Hajrah N.H., Sabir J.S.M., Malik A. Genome-driven discovery of enzymes with industrial implications from the genus *Aneurinibacillus* // Microorganisms. 2021. Vol. 26. PP. 499. doi: 10.3390/microorganisms9030499

27. Takagi H., Shida O., Kadowaki K., Komagata K., Uda S. Characterization of *Bacillus brevis* with descriptions of *Bacillus migulanus* sp. nov., *Bacillus choshinensis* sp. nov., *Bacillus parabrevis* sp. nov., and *Bacillus galactophilus* sp. nov. // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 1993. Vol. 43, № 2. PP. 221–231. doi: 10.1099/00207713-43-2-221
28. Kevbrin V., Zengler K., Lysenko A., Wiegel J. *Anoxybacillus kamchatkensis* sp. nov., a novel thermophilic facultative aerobic bacterium with a broad pH optimum from the Geyser valley, Kamchatka // Extremophiles. 2005. Vol. 9, № 5. PP. 391–398. doi: 10.1007/s00792-005-0479-7
29. Lee S.J., Lee Y.J., Ryu N., Park S., Jeong H., Lee S.J., Kim B.C., Lee D.W., Lee H.S. Draft genome sequence of the thermophilic bacterium *Anoxybacillus kamchatkensis* G10 // Journal of Bacteriology. 2012. Vol. 194, № 23. PP. 6684–6685. doi: 10.1128/JB.01877-12
30. Gul-Guven R., Guven K., Poli A., Nicolaus B. *Anoxybacillus kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* subsp. nov., a thermophilic bacterium isolated from a hot spring in Batman // Journal of General and Applied Microbiology. 2008. Vol. 54, № 6. PP. 327–334. doi: 10.2323/jgam.54.327

References

1. Chilakamarry CR, Sakinah AM, Zularisam A, Sirohi R, Khilji IA, Ahmad N, Pandey A. Advances in solid-state fermentation for bioconversion of agricultural wastes to value-added products: Opportunities and challenges. *Bioresource Technology*. 2022;343:126065. doi: 10.1016/j.biortech.2021.126065
2. Awogbemi O, Von Kallon DV. Pretreatment techniques for agricultural waste. *CSCEE*. 2022;6:100229. doi: 10.1016/j.cscee.2022.100229
3. Tahseen S, Basheer-Salimia R, Hawamde F, Sánchez A. Recycling of organic wastes through composting: process performance and compost application in agriculture. *Agronomy*. 2020;10(11):1838. doi: 10.3390/agronomy10111838
4. Becker SJ, Ebrahimzadeh A, Plaza Herrada BM, Lao MT. Characterization of compost based on crop residues: changes in some chemical and physical properties of the soil after applying the compost as organic. *Commun. Soil Sci. Plant. Anal.* 2010;41(6):696-708. doi: 10.1080/00103620903563931
5. Muhammad J, Khan S, Lei M, Khan MA, Nawab J, Rashid A, Ullah S, Khisro SB. Application of poultry manure in agriculture fields leads to food plant contamination with potentially toxic elements and causes health risk. *Environ. Technol.* 2020;19:100909. doi: 10.1016/j.eti.2020.100909
6. Rayne N, Lawrence A. Livestock manure and the impacts on soil health: a review. *Soil Systems*. 2020;4(4):64. doi: 10.3390/soilsystems4040064
7. Isikgora FH, Remzi Becer C. Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. *Polymer Chemistry*. 2015;6:4497-4559. doi: 10.1039/C5PY00263J
8. Kuba T, Tschöll A, Partl C, Meyer K, Insam H. Wood ash admixture to organic wastes improves compost and its performance. *Agric. Ecosyst. Environ.* 2008;127(1-2):43-49. doi: 10.1016/j.agee.2008.02.012
9. Huang GF, Wu QT, Wong JWC, Nagar BB. Transformation of organic matter during co-composting of pig manure with sawdust. *Bioresource Technology*. 2006;97(15):1834-1842. doi: 10.1016/j.biortech.2005.08.024
10. Peirce JJ, Weiner RF, Vesilind PA. Chapter 14 - Reuse, Recycling, and Recovery. In: *Environmental Pollution and Control*, 4th edn. Butterworth-Heinemann ; 1998. pp. 177-191.
11. Kulikowska D, Gusiati ZM. Sewage sludge composting in a two-stage system: Carbon and nitrogen transformations and potential ecological risk assessment. *Waste Management*. 2015;38:312-320. doi: 10.1016/j.wasman.2014.12.019
12. Ogunwande GA, Osunade JA. Passive aeration composting of chicken litter: effects of aeration pipe orientation and perforation size on losses of compost elements. *J. Environ. Manag.* 2011;92:85-91. doi: 10.1016/j.jenvman.2010.08.026

13. Azim K, Soudi B, Boukhari S, Perissol C, Roussos S, Thami Alami I. Composting parameters and compost quality: a literature review. *Organic Agriculture*. 2018;8:141-158. doi: 10.1007/s13165-017-0180-z
14. GOST 33830-2016. Organic fertilizers based on animal waste. Technical conditions. M: Standartinform; 2020. In Russian
15. Gerasimchuk AL, Ivasenko DA, Bukhtiyarova PA, Antsiferov DV, Frank YA. Search for new cultured lipophilic bacteria in industrial fat-containing wastes. *BIO Web Conf*. 2020;23:002012. doi: 10.1051/bioconf/20202302012
16. Möller EM, Bahnweg G, Sandermann H, Geiger HH. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. *Nucleic Acids Research*. 1992;20(22):6115-6116. doi: 10.1093/nar/20.22.6115
17. Devi S, Sharma CR, Singh K. Microbiological biodiversity in poultry and paddy straw wastes in composting systems. *Braz. J. Microbiol*. 2012;43:288-296. doi: 10.1590/S1517-838220120001000034
18. Swain MR, Laxminarayana K, Ray RC. Phosphorus solubilization by thermotolerant *Bacillus subtilis* isolated from cow dung microflora. *Agricultural Research*. 2012;1(3):273-279. doi: 10.1007/s40003-012-0022-x
19. Moreno B, Vivas A, Nogales R, Benítez E. Solvent tolerance acquired by *Brevibacillus brevis* during an olive-waste vermicomposting process. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2009;72(8):2109-2114. doi: 10.1016/j.ecoenv.2009.06.011
20. Chen MY, Tsay SS, Chen KY, Shi YC, Lin YT, Lin GH. *Pseudoxanthomonas taiwanensis* sp. nov., a novel thermophilic, N₂O-producing species isolated from hot springs. *IJSEM*. 2002;52(6):2155-2161. doi: 10.1099/00207713-52-6-2141
21. Priest F, Goodfellow M, Shute LA, Berkeley R. *Bacillus amyloliquefaciens* sp. nov. norn. rev. *IJSB*. 1987;37:69-71.
22. Gotor-Vila A, Teixidó N, Sisquella M, Torres R, Usall J. Biological characterization of the biocontrol agent *Bacillus amyloliquefaciens* CPA-8: The effect of temperature, pH and water activity on growth, susceptibility to antibiotics and detection of enterotoxigenic genes. *Current Microbiology*. 2017;74(9):1089-1099. doi: 10.1007/s00284-017-1289-8
23. Meier-Stauffer K, Busse H, Rainey F, Burghardt J, Scheberl A, Hollaus LF, Kuen B, Makristathis A, Sleytr U, & Paulmessen I. Description of *Bacillus thermoaerophilus* sp. nov., to include sugar beet isolates and *Bacillus brevis* ATCC 12990 T. *IJSEM*. 1996;46:532-541.
24. Zottig X, Meddeb-Mouelhi F, Charbonneau DM, Beauregard M. Characterization of a novel alkalophilic lipase from *Aneurinibacillus thermoaerophilus*: lid heterogeneity and assignment to family I.5. *Protein J*. 2017;36:478-488. doi: 10.1007/s10930-017-9743-9
25. Acharya S, Chaudhary A. Alkaline cellulase produced by a newly isolated thermophilic *Aneurinibacillus thermoaerophilus* WBS2 from hot spring, India. *Afr. J. Microbiol. Res*. 2012;6:5453-5458. doi: 10.5897/AJMR11.1491
26. Kamli MR, Alzahrani NAY, Hajrah NH, Sabir JSM, Malik A. Genome-driven discovery of enzymes with industrial implications from the genus *Aneurinibacillus*. *Microorganisms*. 2021;26:499. doi: 10.3390/microorganisms9030499
27. Takagi H, Shida O, Kadowaki K, Komagata K, Uda S. Characterization of *Bacillus brevis* with descriptions of *Bacillus migulanus* sp. nov., *Bacillus choshinensis* sp. nov., *Bacillus parabrevis* sp. nov., and *Bacillus galactophilus* sp. nov. *IJSEM*. 1993;43(2):221-231. doi: 10.1099/00207713-43-2-221
28. Kevbrin V, Zengler K, Lysenko A, Wiegel J. *Anoxybacillus kamchatkensis* sp. nov., a novel thermophilic facultative aerobic bacterium with a broad pH optimum from the Geyser valley, Kamchatka. *Extremophiles*. 2005;9(5):391-398. doi: 10.1007/s00792-005-0479-7
29. Lee SJ, Lee YJ, Ryu N, Park S, Jeong H, Lee SJ, Kim BC, Lee DW, Lee HS. Draft genome sequence of the thermophilic bacterium *Anoxybacillus kamchatkensis* G10. *J. Bacteriol*. 2012;194(23):6684-6685. doi: 10.1128/JB.01877-12

30. Gul-Guven R, Guven K, Poli A, Nicolaus B. *Anoxybacillus kamchatkensis* subsp. *asaccharedens* subsp. nov., a thermophilic bacterium isolated from a hot spring in Batman. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 2008;54(6):327-334. doi: 10.2323/jgam.54.327

Информация об авторах:

Ивасенко Денис Александрович, ст. преп. кафедры ихтиологии и гидробиологии, Национальный исследовательский Томский государственный университет (Томск, Россия); директор ООО «Дарвин» (Томск, Россия).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7132-182X>

E-mail: ivasenko.da@mail.ru

Франк Юлия Александровна, доцент, канд. биол. наук, доцент кафедры ихтиологии и гидробиологии, Национальный исследовательский Томский государственный университет (Томск, Россия); заместитель директора по научной работе, ООО «Дарвин» (Томск, Россия).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6347-4009>

E-mail: yulia.a.frank@gmail.com

Перченко Роман Викторович, аспирант, Биологический институт, Национальный исследовательский Томский государственный университет (Томск, Россия).

E-mail: perchenko-roman@mail.ru

Рыбкин Данила Сергеевич, главный технолог, ООО «Дарвин» (Томск, Россия).

E-mail: danila.rybkin@gmail.com

Герасимчук Анна Леонидовна, канд. биол. наук, доцент кафедры ихтиологии и гидробиологии, Национальный исследовательский Томский государственный университет (Томск, Россия).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2945-2364>

E-mail: gerasimchuk_ann@mail.ru

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Information about the authors:

Denis A. Ivasenko, Senior lecturer at the Department of Ichthyology and Hydrobiology, National Research Tomsk State University (Tomsk, Russian Federation); Director, Darwin LLC (Tomsk, Russia).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7132-182X>

E-mail: ivasenko.da@mail.ru

Yulia A. Frank, Associate professor, PhD, Associate Professor of the Department of Ichthyology and Hydrobiology, National Research Tomsk State University (Tomsk, Russian Federation); Deputy Director for Research, Darwin LLC (Tomsk, Russian Federation).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6347-4009>

E-mail: yulia.a.frank@gmail.com

Roman V. Perchenko, Graduate student, Biological Institute, National Research Tomsk State University (Tomsk, Russian Federation).

E-mail: perchenko-roman@mail.ru

Danila S. Rybkin, Chief Technologist, Darwin LLC (Tomsk, Russian Federation).

E-mail: danila.rybkin@gmail.com

Anna L. Gerasimchuk, PhD, Associate Professor, Department of Ichthyology and Hydrobiology, National Research Tomsk State University (Tomsk, Russian Federation).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2945-2364>

E-mail: gerasimchuk_ann@mail.ru

The Authors declare no conflict of interest.

*Статья поступила в редакцию 13.03.2024;
одобрена после рецензирования 27.04.2024; принята к публикации 14.06.2024.*

*The article was submitted 13.03.2024;
approved after reviewing 27.04.2024; accepted for publication 14.06.2024.*