

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 579.63+579.222.2

**ВЛИЯНИЕ БИОАУГМЕНТАЦИИ *BACILLUS SUBTILIS*,
BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS, *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*
НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ КОМПОСТИРОВАНИЯ ПИЩЕВЫХ ОТХОДОВ**

© 2024 г. В. В. Миронов^{а, *}, А. А. Щелушкина^а, В. В. Острикова^а, А. А. Клюкина^а,
А. В. Вантеева^а, И. А. Мольдон^а, В. Г. Жуков^а, И. Б. Котова^б, Ю. А. Николаев^а

^аИнститут микробиологии имени С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

^бБиологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

*e-mail: 7390530@gmail.com

Поступила в редакцию 27.10.2023 г.

После исправления 01.11.2023 г.

Принята к опубликованию 04.11.2023 г.

Применение инокулята, содержащего автохтонные компостные микроорганизмы *Bacillus subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *Pseudomonas aeruginosa*, позволило усилить биodeградацию пищевых отходов при компостировании. Выживаемость интродуцированных микроорганизмов была проверена классическими микробиологическими и молекулярно-биологическими методами. Интродукция позволила продлить высокотемпературную стадию на 4 сут, предотвратить закисление среды, увеличить деградацию органического вещества и испарение влаги, что привело к уменьшению массы отходов на 51% за две недели. Интродуцированные *P. aeruginosa*, по всей видимости, играли ключевую роль на начальной стадии и не были обнаружены после повышения температуры до 60°C.

Ключевые слова: пищевые отходы, биоаугментация, компостирование, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Pseudomonas aeruginosa*

DOI: 10.31857/S0026365624020209

Биоаугментация и введение питательных веществ и других дополнительных компонентов способствует повышению численности и биоразнообразия микробиоты (Tyagi et al., 2010), расширению спектра действующих ферментов (метаболических реакций), ускоренному разложению органических веществ, сокращению выбросов летучих соединений, стабилизации продуктов компостирования (Lei et al., 2000; Xi et al., 2005) и устранению патогенов (Zhong et al., 2021). На эффективность биоаугментации могут значительно влиять: изменение температуры, содержание влаги, pH, доступность питательных веществ (Nakasaki et al., 2013; Song et al., 2018; Niu, Li, 2022), так как разные микроорганизмы имеют различия в проявлении ферментативной активности в зависимости от набора физико-химических факторов (Sharma et al., 2018). Успех биоаугментации зависит от степени адаптации микроорганизмов инокулята к условиям процесса компостирования. Интродукция консорциумов микроорганизмов, включающих виды *Bacillus subtilis* и *B. amyloliquefaciens*, приводит к продлению высокотемпературной стадии, что положительно отражается на компостировании (Li et al.,

2019; Wan et al., 2020). Включение в состав инокулятов бактерий *Pseudomonas aeruginosa* (Awasthi et al., 2015), обладающих высокой способностью биodeградации большого количества соединений (Gibello et al., 2011), также перспективно.

Нестабильность состава и свойств пищевых отходов (ПО) является ограничивающим фактором при биоаугментации. Мы предположили, что использование микроорганизмов, имеющих различные адаптационные и метаболические способности, будет эффективным приемом ускорения компостирования ПО.

Целью нашей работы было оценить влияние внесения автохтонных, выделенных из компостируемых отходов, культур *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* и *P. aeruginosa* на основные параметры компостирования ПО и проверить их выживаемость.

В экспериментах использовались ПО, состоящие из просроченных продуктов типичного состава (мас. %): картофель — 18.0, капуста — 18.0, яблоки — 7.2, апельсины — 7.2, бананы — 7.2, фарш мясной — 3.6, рыба — 1.4, хлеб — 7.2, творог — 1.4, яйцо куриное — 0.6; упаковочные материалы из

полиэтилентерефталата — 5.2% и древесная щепа — 23.0%. Компоненты ПО были предварительно измельчены до размера 10–20 мм и тщательно перемешаны. Компостирование проводили в течение 28 сут на испытательном лабораторном стенде в исследовательской группе микробных процессов конверсии органических отходов (ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, РФ), описанном ранее (Mironov et al., 2021). Было задействовано 2 камеры с рабочим объемом 10 л ПО каждая: с контрольным субстратом (К) и биоаугментацией (Б). Масса каждого варианта субстрата составляла 4516 ± 295 г (масса сухого органического вещества (ОВ) 1594 ± 104 г). Динамику изменений pH субстрата оценивали в суспензии водной вытяжки на лабораторном pH-метре 780 pH Meter (“Metrohm AG”, Швейцария). Влажность (w, %) определяли термогравиметрическим методом в муфельной печи ПМ-16М-1200 (“ЭВС”, Россия). Потери влаги в ходе эксперимента восполнялись водопроводной водой до 60%. Для определения ОВ (%) сухую навеску сжигали в муфельной печи при температуре 550°C (Chang et al., 2023). Для инокулята были использованы бактериальные культуры, ранее выделенные нами из отходов на разных стадиях компостирования: *B. subtilis* (PRJNA979896), *B. amyloliquefaciens* (PRJNA979896) и *P. aeruginosa* (PRJNA979896). Культуры выращивали раздельно в 150 мл среды LB (Luria-Bertani, состав (г/л): триптон — 10.0, дрожжевой экстракт — 5.0, NaCl — 5.0; pH 5.9; стерилизация при 0.5 атм) при 28°C с непрерывным перемешиванием (130 об. мин^{-1}) в течение 1 сут, а затем смешивали в равном количестве (об./об.). В субстрат Б добавляли 300 мл этой смеси для получения итоговой концентрации клеток $\sim 10^8$ КОЕ/г ПО. В контрольный вариант добавляли 300 мл стерильной среды LB. ПО равномерно перемешивали. Выживаемость интродуцированных микроорганизмов была проверена на 0 и 7 сут компостирования с помощью посевов на плотную питательную среду LB, значения общего микробного числа (ОМЧ) получали после 3 сут инкубирования чашек Петри при 28°C. Присутствие *P. aeruginosa* было установлено на среде LB, с помощью диагностических признаков – образование яркого сине-зеленого пигмента пиоцианина и появление характерного запаха. На примере *B. amyloliquefaciens* была подтверждена выживаемость интродуцированных микроорганизмов с помощью молекулярно-биологических методов. ПЦР в реальном времени провели с системой высокоспецифичных праймеров, разработанных для *B. amyloliquefaciens*, пригодных для детектирования данного штамма в присутствии родственных штаммов. Целевым геном для *B. amyloliquefaciens* являлся *holA*, кодирующий субъединицу дельта ДНК полимеразы III. Последовательности праймеров: Bam–*holA*–F 5'-CATAATCCATCACTGCAAGT-3' и Bam–*holA*–R5'-GCCAACCAATTCGACTG-3'. Препараты ДНК были выделены с использованием набора FastDNA™ SPIN Kit for Soil. Значение

любого параметра измерялось не менее двух раз для всех видов исследований.

Динамика изменения параметров компостирования субстрата К и Б отличалась. Режим высоких температур (55–70°C) в субстрате Б был достигнут на 2-е сут за счет выделения теплоты в результате жизнедеятельности микроорганизмов, тогда как в субстрате К только на 6-е сут (рис. 1а).

Интродукция привела к сокращению времени достижения высокотемпературной стадии и увеличению ее продолжительности на 4 сут. Это опосредовано интродукцией *Bacillus* и *Pseudomonas* в субстрат Б, влияющих прямо, за счет гидролиза и последующего разложения легкодоступных субстратов, или косвенно, за счет развития активных микроорганизмов в высокотемпературной стадии, к примеру, некоторых видов *Bacillus*, *Lactobacillus* и *Streptomyces* (Chang et al., 2023). В случае субстрата К на 2 сут наблюдалось снижение потребления кислорода и сохранение температуры $45.1 \pm 0.7^\circ\text{C}$ (рис. 1а, 1в). Схожие результаты были получены Grgić et al. (2019) при инокуляции автохтонных культур *B. subtilis* и *P. aeruginosa*. Различия в динамике процесса между субстратами в первые 7 сут связано с закислением среды в субстрате К, pH снизился с 6.87 до 5.57 (рис. 1б). В то же время pH субстрата Б повысился до 7.50, что не оказало негативного влияния на динамику процесса. Таким образом, биоаугментация предотвращала закисление среды, что способствовало более высокой микробной активности. Наши результаты подтверждают исследование Song et al. (2018), в котором внесение инокулята, включающего *Bacillus* и *Pseudomonas*, в ПО способствовало оптимизации уровня pH. ОМЧ в исходных ПО составило 3.6×10^{10} КОЕ/г для субстрата К и $\sim 10^{11}$ КОЕ/г ПО для субстрата Б. *P. aeruginosa* была обнаружена только в субстрате Б в количестве 4.0×10^8 КОЕ/г. На 7-е сут компостирования *P. aeruginosa* не выявлена в обоих субстратах. Данные бактерии не выжили вследствие высокой температуры $> 60^\circ\text{C}$ в течение 6 сут. Это положительный показатель для безопасности получаемого продукта. Вероятно, *P. aeruginosa* внесла вклад в биodeградацию на начальной стадии, в первые сутки компостирования при температуре 22–45°C, учитывая способность данных бактерий продуцировать широкий спектр ферментов и их высокую гидролитическую активность (Gibello et al., 2011). Подобный эффект описывался ранее: инокуляция дрожжей рода *Pichia* позволила оптимизировать значения pH и ускорить достижение высокой температуры, что, в свою очередь, привело к их гибели (Nakasaki et al., 2013).

Рост температуры привел к общему снижению численности микроорганизмов на 7-е сут в обоих вариантах примерно на 1 порядок. ОМЧ составило 2×10^9 КОЕ/г для субстрата К и $> 10^9$ КОЕ/г для субстрата Б. С помощью молекулярно-биологических

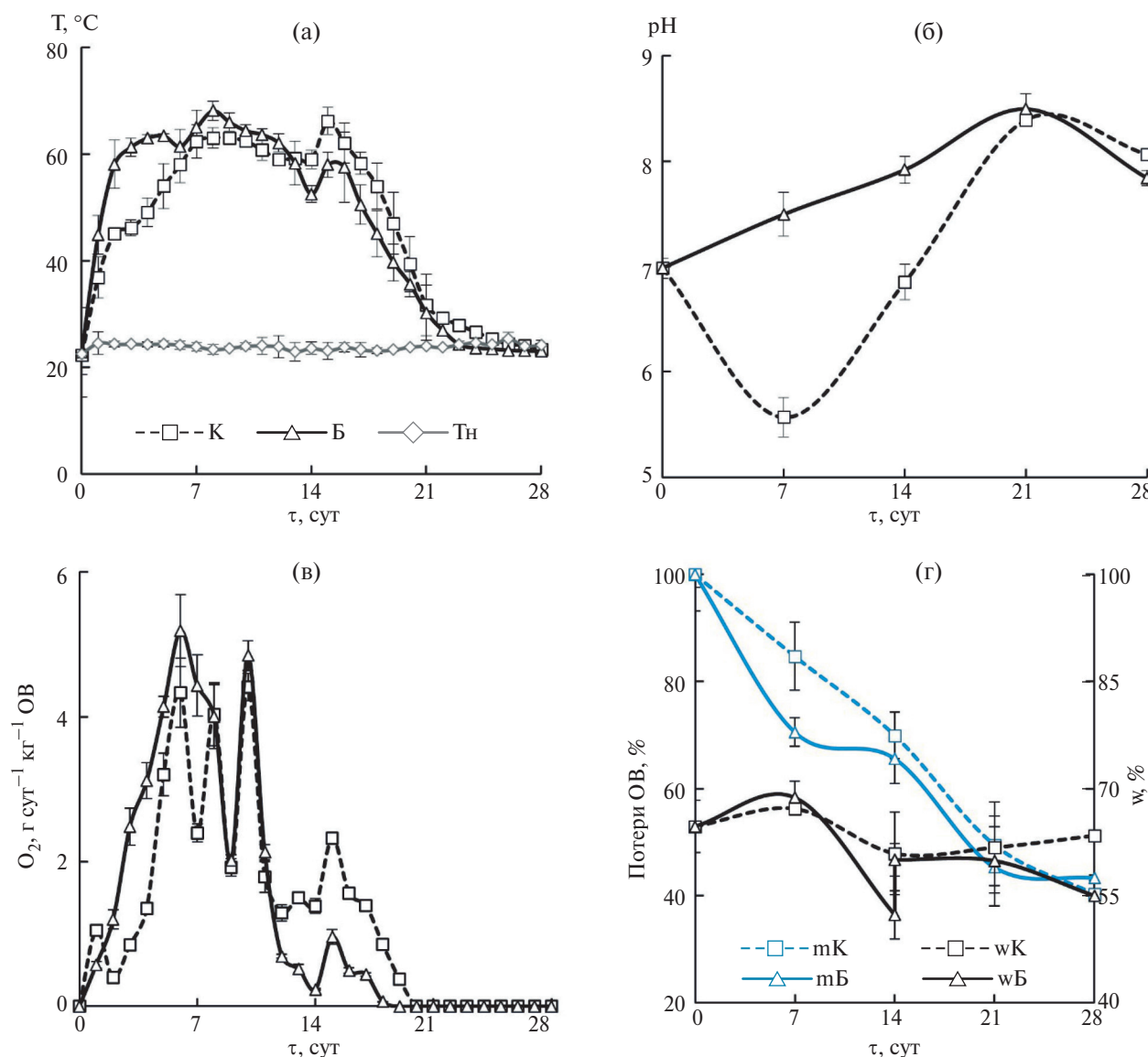


Рис. 1. Динамика изменений условий компостирования субстрата с биоаугментацией (Б) и контрольного субстрата (К): а — температура субстратов (Т), температура окружающей среды (Тн); б — pH; в — расход кислорода (O₂); г — потери сухого ОВ (mK, mB) и влажность (wK, wB) (планки погрешностей представляют собой среднее значение ± стандартное отклонение).

методов подтверждено выживание бактерий рода *Bacillus* на примере *B. amyloliquefaciens*. В исходном субстрате Б количество копий гена *holA* на мг субстрата было 7414.0 ± 3469.4 , на 7-е сут значение уменьшилось в среднем в 3.7 раза, до 1993.4 ± 56.7 копий гена *holA* мг⁻¹. Широко известно о термотолерантности бактерий рода *Bacillus* (Moreno et al., 2021), включая виды, выделенные при компостировании (Nakasaki et al., 2013; Chang et al., 2023), что косвенно подтверждает полученные результаты. Автохтонные компостные бактерии рода *Bacillus* обладают мощным ферментативным аппаратом и способны к активной продукции внеклеточных ферментов с широким температурным оптимумом (Bhattacharya, Pletschke, 2014). Вероятно,

добавление бактериального инокулята вместе с культуральной жидкостью, содержащей экзоферменты и другие метаболиты, также могло способствовать усилению биodeградации ПО. При этом условия повышенной температуры и нейтральный pH в субстрате Б могли поддерживать эффективность работы добавленных метаболитов.

Процессы дыхания, снижения органического вещества и увеличения влажности субстрата Б в первые 7 сут были интенсивнее, чем в контроле, и обусловлены влиянием инокулята. Так, максимум потребления кислорода при инокуляции составил $5.58 \text{ г O}_2 \text{ сут}^{-1} \text{ кг}^{-1} \text{ ОВ}$, тогда как в субстрате К — $4.64 \text{ г O}_2 \text{ сут}^{-1} \text{ кг}^{-1} \text{ ОВ}$ на 6-е сут (рис. 1в). Ballard et al. (2017) также показывают увеличение

дыхательной активности от внесения бактериального инокулята. Значительное различие наблюдалось в скорости потерь сухой массы ОВ (рис. 1г). Потери ОВ инокулированного субстрата за первые 7 сут были на 14% больше контрольного. В этот же период влажность субстратов увеличилась с 65 до 67% (К) и 69% (Б). Такой эффект связан с активными гидролитическими процессами и дальнейшим окислением, в ходе чего ОВ метаболизировалось, и происходило интенсивное образование воды, а баланс между образованием и потерей за счет испарения смешался. В следующий период наблюдения с 7-х по 14-е сут в субстрате Б, наоборот, происходила значительная потеря влаги с 68 до 52% за счет испарения. Вероятно, в результате дальнейшего роста температуры до максимума ($68.2 \pm 1.8^\circ\text{C}$) произошло замедление микробной активности, что обусловило снижение дыхания на 8–9-е сут до локального минимума $2.02 \text{ г О}_2 \text{ сут}^{-1} \text{ кг}^{-1}$ ОВ и интенсивности разложения ОВ — масса оставалась неизменной. После выравнивания влажности субстрата Б до 60% на 14-е сут (рис. 1 г), была возобновлена микробная активность, что подтверждалось увеличением дыхания и потерей ОВ с 14 по 21 сут. В контрольном субстрате количество испарившейся и образовавшейся влаги находилось в балансе за счет менее интенсивного саморазогрева, поэтому ОВ потреблялось равномерно. За 14 сут масса субстратов К и Б уменьшилась на 37 и 51%, соответственно. После 21-х сут микробное дыхание в обоих субстратах снижалось до минимума. В итоге на 28 сут компостирования различия между вариантами отсутствовали. Потери ОВ в обоих вариантах составили 57–60% от начальной массы субстратов.

Таким образом, биоаугментация автохтонными компостными микроорганизмами *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* и *P. aeruginosa* позволила интенсифицировать компостирование ПО на начальной стадии, что привело к сокращению массы отходов на 51% за 14 сут. Эффект обусловлен увеличением периода высокой температуры на 4 сут и усилением разложения ОВ без закисления среды. Это может быть полезным инструментом для повышения производительности внутрикамерных систем компостирования за счет быстрого сокращения объема отходов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Awasthi M.K., Pandey A.K., Bundela P.S., Khan J. Co-composting of organic fraction of municipal solid waste mixed with different bulking waste: characterization of physicochemical parameters and microbial enzymatic dynamic // *Bioresour. Technol.* 2015. V. 182. P. 200–207.
- Ballardo C., Barrena R., Artola A., Sánchez A. A novel strategy for producing compost with enhanced biopesticide properties through solid-state fermentation of bio-waste and inoculation with *Bacillus thuringiensis* // *Waste Manage.* 2017. V. 70. P. 53–58.
- Bhattacharya A., Pletschke B. Thermophilic *Bacilli* and their enzymes in composting // *Composting for sustainable agriculture.* 2014. V. 3. P. 103–124.
- Chang Y., Zhou K., Yang T., Zhao X., Li R., Li J., Xu S., Feng Z., Ding X., Zhang L., Shi X., Su J., Li J., Wei Y. *Bacillus licheniformis* inoculation promoted humification process for kitchen waste composting: Organic components transformation and bacterial metabolic mechanism // *Environmental Research.* 2023. V. 237. № 2. P. 15.
- Gibello A., Vela A.I., Martín M., Mengs G., Alonso P.Z., Garbi C., Fernández-Garayzábal J.F. *Pseudomonas composti* sp. nov., isolated from compost samples // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2011. V. 61. P. 2962–2966.
- Grgić D.K., Domanovac M.V., Domanovac T. et al. Influence of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* BSW and clinoptilolite addition on the biowaste composting process // *Arab. J. Sci. Eng.* 2019. V. 44. P. 5399–5409.
- Lei F., Gheynst J.S.V. The effect of microbial inoculation and pH on microbial community structure changes during composting // *Process Biochem.* 2000. V. 35. P. 923–929.
- Li C., Li H., Yao T., Su M., Ran F., Han B., Li J. Microbial inoculation influences bacterial community succession and physicochemical characteristics during pig manure composting with corn straw // *Bioresour. Technol.* 2019. V. 289. Art. 121653.
- Mironov V., Vanteeva A., Merkel A. Microbiological activity during co-composting of food and agricultural waste for soil amendment // *Agronomy.* 2021. V. 11. Art. 928.
- Moreno J., López-González J.A., Arcos-Nievas M.A., Suárez-Estrella F., Jurado M.M., Estrella-González M.J., López M.J. Revisiting the succession of microbial populations throughout composting: a matter of thermotolerance // *Sci. Total Environ.* 2021. V. 773. Art. 145587.
- Nakasaki K., Araya S., Mimoto H. Inoculation of *Pichia kudriavzevii* RB1 degrades the organic acids present in raw compost material and accelerates composting // *Bioresour. Technol.* 2013. V. 144. P. 521–528.
- Niu J., Li X. Effects of microbial inoculation with different indigenous *Bacillus* species on physicochemical characteristics and bacterial succession during short-term composting // *Fermentation.* 2022. V. 8. Art. 152.
- Sharma P., Melkania U. Effect of bioaugmentation on hydrogen production from organic fraction of municipal solid waste // *Int. J. Hydrogen Energy.* 2018. V. 43. P. 7290–7298.

- Song C., Li M., Qi H., Zhang Y., Liu D., Xia X., Pan H., Xi B. Impact of anti-acidification microbial consortium on carbohydrate metabolism of key microbes during food waste composting // *Bioresour. Technol.* 2018. V. 259. P. 1–9.
- Tyagi M., da Fonseca M.M.R., de Carvalho C.C.C.R. Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes // *Biodegradation*. 2010. V. 22. P. 231–241.
- Wan L., Wang X., Cong C., Li J., Xu Y., Li X., Hou F. Effect of inoculating microorganisms in chicken manure composting with maize straw // *Bioresour. Technol.* 2020. V. 301. Art. 122730.
- Xi B., Zhang G., Liu H. Process kinetics of inoculation composting of municipal solid waste // *J. Hazard. Mater.* 2005. V. 124. P. 165–172.
- Zhong B., An X., An W., Xiao X., Li H., Xia X., Zhang Q. Effect of bioaugmentation on lignocellulose degradation and antibiotic resistance genes removal during biogas residues composting // *Bioresour. Technol.* 2021. V. 340. Art. 125742.

SHORT COMMUNICATIONS

Influence of Bioaugmentation of *Bacillus subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *Pseudomonas aeruginosa* on the Efficiency of Food Waste Composting

V. V. Mironov¹, *, A. A. Shchelushkina¹, V. V. Ostriкова¹, A. A. Klyukina¹,
A. V. Vanteeva¹, I. A. Moldon¹, V. G. Zhukov¹, I. B. Kotova², and Yu. A. Nikolaev¹

¹Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology,
Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

²Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: 7390530@gmail.com

Received October 27, 2023; revised November 3, 2023; accepted November 4, 2023

Abstract—The use of inoculum containing autochthonous compost microorganisms *Bacillus subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *Pseudomonas aeruginosa* allowed to enhance biodegradation of food waste during composting. The survival of the introduced microorganisms was verified by classical microbiological and molecular biological methods. The introduction extended the high-temperature stage by 4 days, prevented acidification of the medium, increased organic matter degradation and moisture evaporation, resulting in a 51% reduction in waste weight in two weeks. Introduced *P. aeruginosa* appeared to play a key role in the initial stage and was not detected after increasing the temperature to 60°C.

Keywords: food waste, bioaugmentation, composting, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Pseudomonas aeruginosa*