

## ***Rhodotorula glutinis* как компонент биопленок навозных стоков**

Л.В. Пилип<sup>1</sup>, Н.В. Сырчина<sup>2</sup>, Е.П. Колеватых<sup>3</sup>,  
В.А. Козвонин<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> Вятский государственный агротехнологический университет,  
г. Киров

<sup>2</sup> Вятский государственный университет,  
г. Киров

<sup>3</sup> Кировский государственный медицинский университет,  
г. Киров

pilip\_larisa@mail.ru, nvms1956@mail.ru, niokgma@yandex.ru

### **Аннотация**

Анализ биопленок навозных стоков выявил ассоциацию *Clostridium* ssp. (91.09 %), *Escherichia coli* (6.07), *Bacteroides* sp. (1.06), *Sarcina ventriculi* (0.91), *Klebsiella* sp. (0.14 %) и дрожжи *Rhodotorula glutinis* в объеме 0.11 % от общего числа микроорганизмов. Пигментированные дрожжи *Rhodotorula glutinis* обладают низкой биохимической активностью, устойчивы к изменениям pH. В нейтральной среде (pH 7.0±0.3) количество *Rhodotorula glutinis* составило 0.11 % от общего числа микроорганизмов ( $7 \cdot 10^4 \pm 2.2$  КОЕ/мл), но при смещении pH до 5.5±0.1 (подкисление проводили 10 %-ным раствором серной кислоты) количество дрожжей выросло до 1.01 % ( $9 \cdot 10^5 \pm 1.1$  КОЕ/мл). Дрожжи данного вида сохраняют свою жизнеспособность при повышении температуры. Так, при нагревании до 70 °С (в биореакторных установках при сепарировании навозных стоков) количество дрожжей составило 0.06 % от общего микробного сообщества ( $3 \cdot 10^2 \pm 1.2$  КОЕ/мл). Выявление в свиных навозных стоках дрожжей *Rhodotorula glutinis* ранее в отечественной и зарубежной литературе не описано, их роль требует дальнейшего исследования.

### **Ключевые слова:**

отходы животноводства, навоз, *Rhodotorula glutinis*, биопленки, сообщество микроорганизмов

### **Введение**

Органические удобрения на основе отходов животноводства и птицеводства (навоз животных, навозные стоки, помет птиц), содержащие широкий спектр минеральных и органических веществ и служащие питательной средой для различных микроорганизмов, широко используются для повышения плодородия пахотных земель. Периоду внесения удобрений в почву предшествует этап хранения навоза в навозных ваннах, а затем – в лагунах, сопровождающийся микробиологическими процессами. На указанном этапе длительного хранения (6–12 месяцев) навозных стоков (далее – НС), а также внесения их в почву сельскохозяйственных угодий регистрируют максимальное запаховое загрязнение близлежащих территорий, рас-

## ***Rhodotorula glutinis* as a component of manure biofilm effluents**

L.V. Pilip<sup>1</sup>, N.V. Syrchina<sup>2</sup>, E.P. Kolevatykh<sup>3</sup>,  
V.A. Kozvonin<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> Vyatka State Agrotechnological University,  
Kirov

<sup>2</sup> Vyatka State University,  
Kirov

<sup>3</sup> Kirov State Medical University,  
Kirov

pilip\_larisa@mail.ru, nvms1956@mail.ru, niokgma@yandex.ru

### **Abstract**

Analysis of manure biofilm effluents revealed an association of *Clostridium* ssp. (91.09 %), *Escherichia coli* (6.07), *Bacteroides* sp. (1.06), *Sarcina ventriculi* (0.91), *Klebsiella* sp. (0.14 %), and yeast *Rhodotorula glutinis* in the amount of 0.11 % of the total number of microorganisms. The pigmented yeast *Rhodotorula glutinis* has a low biochemical activity and is resistant to pH changes. In a natural environment (pH 7.0 ± 0.3), the amount of *Rhodotorula glutinis* was 0.11% of the total number of microorganisms ( $7 \cdot 10^4 \pm 2.2$  CFU/ml), but with a pH shift to 5.5 ± 0.1 (acidification was carried out with 10 % sulfuric acid solution), the amount of yeast increased to 1.01 % ( $9 \cdot 10^5 \pm 1.1$  CFU/ml). Yeast of this species retains its viability when the temperature rises, so when heated to 70° C (in bioreactor plants when separating manure effluents), the amount of yeast was 0.06 % of the total microbial community ( $3 \cdot 10^2 \pm 1.2$  CFU/ml). The detection of yeast *Rhodotorula glutinis* in pig manure drains has not been described in the domestic and foreign literature before, their role requires further research.

### **Keywords:**

animal waste, manure, *Rhodotorula glutinis*, biofilms, community of microorganisms

пространяемое с учетом направления ветра на большие расстояния [1, 2]. Наибольший вклад в образование запахообразующих веществ (далее – ЗОВ) вносят гнилостные микроорганизмы, активно развивающиеся в богатом азотистыми соединениями субстрате в условиях дефицита кислорода при pH 7–8.

Микроорганизмы, участвующие в разложении органических компонентов, способны образовывать сообщества как на поверхности НС, формируя микробные пленки (биопленки), так и в толще субстрата. Качественные и количественные характеристики соответствующих микробиологических сообществ и их вклад в эмиссию ЗОВ существенно различаются. Если в толще НС происходит ак-

тивное продуцирование ЗОВ, то в биопленках – частичное поглощение этих веществ [3–5]. Взаимоотношения между отдельными группами микроорганизмов, обитающими в НС, к настоящему времени изучены весьма поверхностно, что затрудняет разработку и внедрение эффективных технологий снижения запахового загрязнения атмосферы биогенными отходами. Детальные исследования микробного состава биопленок НС могут иметь большое практическое значение, поскольку позволят подобрать оптимальные условия, необходимые для формирования сообществ микроорганизмов, активно поглощающих ЗОВ [1, 6].

Цель нашей работы – исследование микробного состава биопленок свиных навозных стоков и изучение некоторых морфо-биохимических и физико-химических свойств *Rhodotorula glutinis*.

## Материалы и методы

Объектом исследования явились нативные свиные НС из навозных ванн влажностью 99 %, рН 6.8. На протяжении 14 дней НС хранили в закрытых темных емкостях из полиэтилентерефалата объемом 1.5 л. В течение указанного периода на поверхности НС формировалась биопленка из микроорганизмов.

Забор материала биопленки производили в стерильных условиях. Последующие исследования проводили в микробиологической лаборатории, где образцы биоматериала культивировали на стандартных и специальных питательных средах после серийных десятикратных разведений (ОФС.1.7.2.0008.15). В процессе исследований определяли концентрацию микробных клеток (КОЕ/г), идентифицировали отдельные микроорганизмы морфологическими и биохимическими методами. Объем выделившихся газов определяли методом вытеснения жидкости, интенсивность и характер запаха НС оценивали органолептическим методом с привлечением группы экспертов из шести человек по шкале от 0 (запах отсутствует) до трех (интенсивный неприятный запах). Эксперимент проводили в трех повторностях со статистической обработкой результатов.

## Результаты и их обсуждение

Общее количество микроорганизмов (далее – ОКМ) в НС составило 65 868 430 КОЕ/мл. Процентное соотношение микробного состава биопленок НС представлено на рисунке.

Согласно полученным результатам, в биопленке НС преобладали анаэробные микроорганизмы *Clostridium* ssp. (91.09 %), *Bacteroides* sp. (1.06), *Sarcina ventriculi* (0.91) и *Klebsiella* sp. (0.14), а также факультативный аэроб *Escherichia coli* (6.07) и дрожжи *Rhodotorula glutinis* (0.11 %). Обнаружение дрожжей рода *Rhodotorula* в биопленках НС свиней является весьма интересным фактом. Благодаря высокой устойчивости к ультрафиолетовому облучению, эти дрожжи в ряде работ рассматривают в качестве маркеров загрязнения окружающей среды отходами нефти, ртутью, хрома и радиоактивными элементами [7], что не характерно для НС.

Дрожжи рода *Rhodotorula glutinis* идентифицировали по характерным оранжево-красным колониям при культивировании на декстрозном агаре Сабуро. При микроскопии отмечали почкующиеся округлые и овальные клетки размерами 2.5–6.0 × 4.0–8.5 мкм, образующие капсулу. Способность к образованию баллистоспор и псевдомицелия отсутствовала. Наличие истинного мицелия и телиоспор в монокультуре и ассоциациях с другими микроорганизмами не зафиксировано.

В ходе биохимических исследований нами отмечена медленная ферментация дрожжами глюкозы, мальтозы, мелецитозы, L-арабинозы, сорбита, рамнозы, маннита, этанола на фоне полного отсутствия усвоения лактозы, эритрита, дульцита, инозита, глюкуроната. Дрожжи слабо используют нитраты, нитриты, лизин, этиламин, не образуют крахмалоподобные вещества.

Согласно нашим исследованиям, *Rhodotorula glutinis* устойчива к изменениям рН, а также сохраняет свою жизнеспособность при повышении температуры. Так, в нейтральной среде (рН 7.0±0.3) количество *Rhodotorula glutinis* составило 0.11 % от общего числа микроорганизмов ( $7 \cdot 10^4 \pm 2.2$  КОЕ/мл), а при снижении рН до 5.5±0.1 (подкисление проводили 10 %-ным раствором серной кислоты)

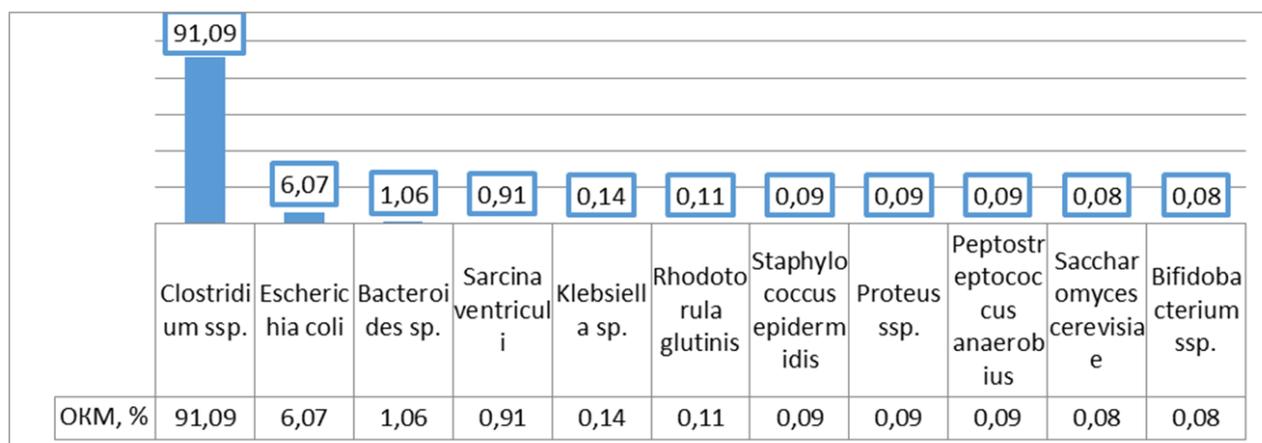


Рисунок. Видовое разнообразие микроорганизмов навозных стоков, %.  
Figure. Species diversity of microorganisms in manure effluents, %.

количество дрожжей выросло почти в 10 раз – до  $1.01 \times 10^5 \pm 1.1$  КОЕ/мл).

В подкисленных НС выделение газообразных продуктов снизилось на 35 %, а интенсивность неприятного запаха НС уменьшилась в три раза. Соответствующий эффект можно объяснить подавлением жизнедеятельности гнилостных микроорганизмов в кислой среде и повышенной устойчивостью дрожжей к наличию в субстрате кислот.

Дрожжи способны сохранять свою жизнеспособность при нагревании до 70 °С. Такие условия реализуются в биореакторных установках при сепарировании НС. Согласно полученным результатам, количество дрожжей в обработанных на соответствующей установке НС, составило 0.06 % от общего числа сохранивших жизнеспособность микроорганизмов ( $3 \times 10^2 \pm 1.2$  КОЕ/мл).

Дрожжи рода *Rhodotorula* (*rhodos* – красный, *torula* – выпуклость) [8] представляют существенный практический интерес. Согласно литературным данным, *Rhodotorula glutinis* способна синтезировать олеиновую, линолевую и пальмитиновую кислоты, поэтому может найти применение в качестве биодизеля третьего поколения [9]. Благодаря синтезу каротиноидов ( $\beta$ -каротин, торулен и торулародин), дрожжи перспективны в качестве кормовых добавок животным, рыбе и ракообразным, а за счет продукции фермента фенилаланин-аммиак-лиазы *Rhodotorula glutinis* могут использоваться для производства аминокислоты фенилаланина – субстрата для синтеза подсластителя аспартама [10, 11]. *Rhodotorula glutinis* способны метаболизировать полициклические ароматические углеводороды, таким образом снижая экологическую нагрузку на окружающую среду [12]. По данным официальной статистики, поголовье свиней в РФ в хозяйствах всех категорий достигло 26 192,9 тыс. голов (на конец 2021 г.), а ежегодное количество образующихся НС приблизилось к 96 млн т. Возможность использования НС в качестве питательной среды для культивирования *Rhodotorula glutinis* может быть одним из направлений утилизации отходов животноводства, что позволит использовать НС свиноферм в качестве питательного субстрата.

## Выводы

В составе биопленок свиных навозных стоков в ассоциации с *Clostridium* ssp., *Bacteroides* sp., *Sarcina ventriculi*, *Klebsiella* sp., *Escherichia coli*, *Rhodotorula glutinis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Proteus* ssp., *Peptostreptococcus anaerobius*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Bifidobacterium* ssp. были выявлены дрожжи рода *Rhodotorula glutinis*.

Доля дрожжей *Rhodotorula glutinis* в нативных НС (рН 7) оказалась весьма незначительной (0.11 % от общей численности микроорганизмов). Биохимическая активность дрожжей низкая. Подкисление НС (до рН 5.5) привело к увеличению численности этих дрожжей практически в 10 раз. Параллельно с возрастанием численности *Rhodotorula glutinis* наблюдается снижение эмиссии ЗОВ в атмосферу. Таким образом, прием подкисления можно использовать не только для стимулирования жизнедеятельности дрожжей, но и для снижения интенсивности запахового загрязнения

воздуха. Обработка НС в биореакторных установках при температуре 70 °С приводит к сокращению численности *Rhodotorula glutinis*, однако дрожжи полностью не погибают и сохраняют способность к размножению.

Выявление дрожжей *Rhodotorula glutinis* требует дальнейших исследований в виде изучения роста монокультур в НС и может рассматриваться как в направлении защиты окружающей среды от супертоксикантов, так и в биотехнологических изысканиях для получения каротиноидных пигментов, ненасыщенных жирных кислот и ферментов.

## Литература

1. Пилип, Л. В. Экологическая проблема отрасли свиноводства / Л. В. Пилип, Н. В. Сырчина // Аграрная наука – сельскому хозяйству : сборник материалов XIV Международной научно-практической конференции. В 2-х книгах. – 2019. – С. 193–196.
2. Сырчина, Н. В. Контроль запахового загрязнения атмосферного воздуха (обзор) / Н. В. Сырчина, Л. В. Пилип, Т. Я. Ашихмина // Теоретическая и прикладная экология. – 2022. – № 2. – С. 26–34.
3. Потехина, Н. В. Биопленки как базовая форма существования микроорганизмов / Н. В. Потехина: учебное пособие. – Москва : Макс-Пресс, 2021. – 76 с.
4. Nozhevnikova, A.N. Multi-species biofilms in ecology, medicine, and biotechnology / A.N. Nozhevnikova, E.A. Botchkova, V.K. Plakunov // Microbiology. – 2015. – Vol. 84, № 6. – P. 731 – 750.
5. Пилип, Л. В. Влияние подкисления навозных стоков на их микробиологические характеристики / Л. В. Пилип, В. А. Козвонин, Н. В. Сырчина [и др.] // Теоретическая и прикладная экология. – 2020. – № 3. – С. 161–167.
6. Пилип, Л. В. Новые подходы к дезодорации свиного навоза / Л. В. Пилип, Н. В. Сырчина // Иппология и ветеринария. – 2018. – № 4 (30). – С. 99–106.
7. Krzyściak P. Występowanie i chorobotwórczość grzybów *Rhodotorula* spp. / P. Krzyściak, A. Halska, A. Macura // Post Mikrobiol. – 2007. – N 46. – P. 291–300.
8. Saenge, C. Efficient concomitant production of lipids and carotenoids by oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* cultured in palm oil mill effluent and application of lipids for biodiesel production / C. Saenge, B. Cheirsilp, T. T. Suksaroge [et al.] // Biotechnol. Bioprocess Engineering. – 2011. – Vol. 16, N. 1. – P. 23–33.
9. Li C. J. Genomics and lipidomics analysis of the biotechnologically important oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* ZHK provides new insights into its lipid and carotenoid metabolism / C. J. Li, D. Zhao, P. Cheng // BMC Genomics. – 2020. – N 21. – P. 834.
10. Qiang L. Perspectives of microbial oils for biodiesel production / L. Qiang, D. Wei, D. Liu // Applied Microbiol. Biotechnol. – 2008. – Vol. 80. – P. 749–756.
11. *Rhodotorula glutinis*–potential source of lipids, carotenoids, and enzymes for use in industries / A. M. Kot, S. Błazejak, A. Kurcz [et al.] // Applied Microbiol. Biotechnol. – 2016. – Vol. 100. – P. 6103–6117.

12. Krupey K. S. Bioindication capabilities of pigment-synthesizing yeasts of the genus *Rhodotorula* / K. S. Krupey // Australian J. Sci. Res. – 2014. – Vol. III, N 1(5). – P. 249–254.

## References

1. Pilip, L.V. Ekologicheskaya problema otrasli svinovodstva [The environmental problem of the pig industry] / L.V. Pilip, N.V. Syrchina // Agrarnaja nauka – sel'skomu hozjajstvu: sbornik materialov XIV Mezhdunarodnoj nauchno-prakticheskoy konferencii [Agrarian science - agriculture: collection of materials of the XIV International scientific and practical conference]. – 2019. – P. 193 – 196.
2. Syrchina, N.V. Kontrol zapakhovogo zagryazneniya atmosfernogo vozdukh (obzor) [Control of odor pollution of atmospheric air (review)] / N.V. Syrchina, L.V. Pilip, T.Ya. Ashihmina // Teoreticheskaja i prikladnaja jekologija [Theoretical and Applied Ecology]. – 2022. – № 2. – P. 26 – 34.
3. Potekhina, N.V. Bioplenki kak bazovaya forma sushchestvovaniya mikroorganizmov [Biofilms as the basic form of existence of microorganisms] / N.V. Potekhina. – Moscow: Max-Press, 2021. – 76 p.
4. Nozhevnikova, A.N. Multi-species biofilms in ecology, medicine, and biotechnology / A.N. Nozhevnikova, E.A. Botchkova, V.K. Plakunov // Microbiology. – 2015. – Vol. 84, № 6. – P. 731 – 750.
5. Pilip, L.V. Vliyanie podkisljeniya navoznykh stokov na ikh mikrobiologicheskie kharakteristiki [The influence of acidification of manure runoff on their microbiological characteristics] / L.V. Pilip, V.A. Kozvonin, N.V. Syrchina [et al.] // Teoreticheskaja i prikladnaja jekologija [Theoretical and Applied Ecology]. – 2020. – № 3. – P. 161–167.
6. Pilip, L.V. Novye podkhody k dezodoratsii svinogo navoza [New approaches to the deodorization of pig manure] / L.V. Pilip, N.V. Syrchina // Ippologija i veterinarija [Hippology and veterinary]. – 2018. – № 4 (30). – P. 99–106.
7. Krzyściak P. Występowanie i chorobotwórczość grzybów *Rhodotorula* spp. / P. Krzyściak, A. Halska, A. Macura // Post Mikrobiol. – 2007. – N 46. – P. 291–300.
8. Saenge, C. Efficient concomitant production of lipids and carotenoids by oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* cultured in palm oil mill effluent and application of lipids for biodiesel production / C. Saenge, B. Cheirsilp, T. T. Suksaroge [et al.] // Biotechnol. Bioprocess Engineering. – 2011. – Vol. 16, N. 1. – P. 23–33.
9. Li C. J. Genomics and lipidomics analysis of the biotechnologically important oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* ZHK provides new insights into its lipid and carotenoid metabolism / C. J. Li, D. Zhao, P. Cheng // BMC Genomics. – 2020. – N 21. – P. 834.
10. Qiang L. Perspectives of microbial oils for biodiesel production / L. Qiang, D. Wei, D. Liu // Applied Microbiol. Biotechnol. – 2008. – Vol. 80. – P. 749–756.
11. *Rhodotorula glutinis*–potential source of lipids, carotenoids, and enzymes for use in industries / A. M. Kot, S. Błażejczak, A. Kurcz [et al.] // Applied Microbiol. Biotechnol. – 2016. – Vol. 100. – P. 6103–6117.
12. Krupey K. S. Bioindication capabilities of pigment-synthesizing yeasts of the genus *Rhodotorula* / K. S. Krupey // Australian J. Sci. Res. – 2014. – Vol. III, N 1(5). – P. 249–254.

## Благодарность:

Авторы выражают искреннюю благодарность редакции журнала «Известия Коми НЦ УрО РАН» за ценные замечания по содержанию и неоценимую помощь в подготовке статьи к публикации.

## Информация об авторах:

**Пилип Лариса Валентиновна** – доцент, кандидат ветеринарных наук, доцент кафедры зоогигиены, физиологии и биохимии Вятского государственного агротехнологического университета; Scopus Author ID: 57210982363, <https://orcid.org/0000-0001-9695-7146> (Российская Федерация, 610017, г. Киров, Октябрьский пр-кт, д. 133; e-mail: pilip\_larisa@mail.ru).

**Сырчина Надежда Викторовна** – доцент, кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории биомониторинга Коми научного центра Уральского отделения РАН и Вятского государственного университета; Scopus Author ID: 57196452423, <https://orcid.org/0000-0001-8049-6760> (Российская Федерация, 610000, г. Киров, ул. Московская, д. 36; e-mail: nvms1956@mail.ru).

**Колеватых Екатерина Петровна** – доцент, кандидат медицинских наук, заведующий кафедрой микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО «Кировский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации»; Scopus Author ID: 57189224032, <https://orcid.org/0000-0001-6147-3555> (Российская Федерация, 610045, г. Киров, ул. Солнечная, д. 39; e-mail: hibica@mail.ru).

**Козвонин Валерий Анатольевич** – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник Центра Компетенций «Экологические технологии и системы» Вятского государственного университета; Scopus Author ID: 57189245704, <https://orcid.org/0000-0002-2447-6949> (Российская Федерация, 610000, г. Киров, ул. Московская, д. 36; e-mail: niokgma@yandex.ru).

#### About the authors:

**Larisa V. Pilip** – Docent, Candidate of Sciences (Veterinary), Department of zoohygiene, physiology, and biochemistry, Vyatka State Agrotechnological University; Scopus Author ID: 57210982363, <https://orcid.org/0000-0001-9695-7146> (Vyatka State Agrotechnological University, 133, Oktyabrsky Ave., Kirov, Russia, 610017; e-mail: pilip\_larisa@mail.ru).

**Nadezhda V. Syrchina** – Docent, Candidate of Sciences (Chemistry), Senior Researcher, Biomonitoring Laboratory, Institute of Biology, Federal Research Centre Komi Science Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Vyatka State University; Scopus Author ID: 57196452423, <https://orcid.org/0000-0001-8049-6760> (Vyatka State University, 36, Moskovskaya St., Kirov, Russia, 610000; e-mail: nvms1956@mail.ru).

**Ekaterina P. Kolevatykh** – Docent, Candidate of Sciences (Medicine), Head of the Department of Microbiology and Virology, Kirov State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation; Scopus Author ID: 57189224032, <https://orcid.org/0000-0001-6147-3555> (Kirov State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, 39, Solnechnaya St., Kirov, Russia, 610045, e-mail: hibica@mail.ru).

**Valeriy A. Kozvonin** – Candidate of Sciences (Medicine), Senior Researcher, Competence Centre “Environmental Technologies and Systems”, Vyatka State University; Scopus Author ID: 57189245704, <https://orcid.org/0000-0002-2447-6949> (Vyatka State University, 36, Moskovskaya St., Kirov, 610000, Russia; e-mail: niokgma@yandex.ru).

#### Для цитирования:

Пилип, Л. В. *Rhodotorula glutinis* как компонент биопленок навозных стоков / Л. В. Пилип, Н. В. Сырчина, Е. П. Колеватых, В. А. Козвонин // Известия Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук. Серия «Экспериментальная биология и экология». – 2022. – № 4 (56). – С. 22–26. УДК 579.64: 676.034.81. DOI 10.19110/1994-5655-2022-4-22-26

#### For citation:

Pilip, N. V. *Rhodotorula glutinis* kak komponent bioplenok navoznykh stokov [*Rhodotorula glutinis* as a component of manure biofilm effluents] / L. V. Pilip, N. V. Syrchina, E. P. Kolevatykh, V. A. Kozvonin // Proceedings of the Komi Science Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences. Series “Experimental Biology and Ecology”. – 2022. – № 4 (56). – P. 22–26. UDC 579.64: 676.034.81. DOI 10.19110/1994-5655-2022-4-22-26

Дата поступления рукописи: 24.06.2022

Прошла рецензирование: 22.08.2022

Принято решение о публикации: 02.09.2022

Received: 24.06.2022

Reviewed: 22.08.2022

Accepted: 02.09.2022