РЕЗУЛЬТАТИ ВИВЧЕННЯ МІКРОФЛОРИ ПОСЛІДУ КУРЕЙ

О. О. Безпалько², аспірант

Національний університет біоресурсів і природокористування України,
вул. Героїв Оборони, 15, м. Київ, 03041, Україна
fotooyou@gmail.com

Мікробіологічний склад курячого посліду має істотний вплив на його подальшу деструкцію. Для утилізації курячого посліду біологічними методами важливим є наявність у посліді поживних речовин, інгібіторів росту (залишків антибіотиків чи дезінфектантів), співвідношення спороутворюючої та не спороутворюючої мікрофлори, а також наявність корисної мікрофлори. Метою роботи було вивчення мікробіологічного складу посліду курей в птахогосподарствах України.

Досліджували курячий послід з птахогосподарств різного масштабу та методу утримання птиці на території України. Відібрані зразки транспортували в термоконтейнері та досліджували мікробіологічно шляхом посіву на загально вживані та селективні середовища. Для визначення кількості спороутворюючої мікрофлори готували суспензію посліду, висівали в матрац зі щільним поживним середовищем та вводили у ватно-марлеву пробку скипидар. Морфологію виділених ізолятів, кислотоутворюючі властивості, каталазну активність та ферментативні властивості вивчали за загально прийнятими методиками.

Встановлено, що в посліді курей, яких утримували в приміщенні відсоток спороутворюючих мікроорганізмів коливався в межах 14,74-21,24 %, а не спороутворюючих – 78,76-85,26 %. В посліді курей, що мали вигул, відсоток спороутворюючих мікроорганізмів коливався в межах 48,93-78,81 %, а не спороутворюючих – 21,19-51,07 %. Середня кількість спороутворюючої мікрофлори за обох умов утримання склала 40,86%, а не спороутворюючої – 59,14 %. За результатами проведених робіт, було виділено 20 ізолятів, із яких 15 % ізолятів мали виражені кислотоутворюючі властивості. На агарі MRS ізоляти мали вигляд маленьких, гладеньких біло-сірих колоній S-форми, в мазках, зафарбованих за Грамом, спостерігали невеличкі грампозитивні палички, що розташовувалися поодинокі, парно, а також короткими ланцюжками. Ізоляти 1, 2 та 3 мали негативну реакцію на каталазу.

*За результатами проведених досліджень, ізолят 1 було ідентифіковано як *Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius*, ізолят 2 – *Lactobacillus reuteri*, а ізолят 3 – *Lactobacillus delbrueckii*.*

Ключові слова: СПОРОУТВОРЮЮЧА МІКРОФЛОРА, НЕ СПОРОУТВОРЮЮЧА МІКРОФЛОРА, ЛАКТОБАКТЕРІЇ, БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ.

²Науковий керівник – В. О. Ушкалов, д. вет. н., професор, академік НААН

RESULTS OF THE STUDY OF THE POULTRY MANURE MICROFLORA

O. O. Bezpalko

National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine

Heroiv Oborony Str.15, Kyiv, Ukraine, 03041

fotooyou@gmail.com

The microbiological composition of chicken manure has a significant impact on its further destruction. For the disposal of chicken manure by biological methods it is important to have in the manure nutrients, growth inhibitors (residues of antibiotics or disinfectants), the ratio of spore-forming and non-spore-forming microflora, as well as the presence of beneficial microflora. The aim of the work was to study the microbiological composition of chicken manure in poultry farms of Ukraine.

Chicken manure from poultry farms of different scale and method of keeping poultry on the territory of Ukraine was studied. Selected samples were transported in a thermal container and examined microbiologically by inoculation on commonly used and selective media. To determine the amount of spore-forming microflora, a slurry suspension was prepared, sown in a mattress with a dense nutrient medium and turpentine was introduced into a cotton gauze plug. The morphology of the isolated microorganisms, acid-forming properties, catalase activity and enzymatic properties were studied according to generally accepted methods.

It was found that in the manure of chickens, which were kept indoors, the percentage of spore-forming microorganisms ranged from 14.74 to 21.24 %, and not spore-forming – 78.76-85.26 %. In the manure of chickens that had grazed, the percentage of spore-forming microorganisms ranged from 48.93 to 78.81 %, and not spore-forming – 21.19-51.07 %. The average amount of spore-forming microflora under both conditions was 40.86 %, and not spore-forming – 59.14 %. According to the results of the work, 20 isolates were isolated, of which 15% of isolates had pronounced acid-forming properties. On MRS agar, the isolates had the appearance of small, smooth white-gray S-shaped colonies, in Gram-stained smears, small gram-positive rods were observed, arranged singly, in pairs, and in short chains. Isolates 1, 2 and 3 had a negative reaction to catalase.

According to the results of the studies, isolate 1 was identified as *Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius*, isolate 2 – *Lactobacillus reuteri*, and isolate 3 – *Lactobacillus delbrueckii*.

Keywords: SPORE-FORMING MICROFLORA, NON SPORE-FORMING MICROFLORA, LACTOBACTERIA, BIOLOGICAL PROPERTIES.

Тривалий час дослідники з різних країн вивчають мікробіологічний склад курячого посліду. Так, наприклад, науковці із Единбурзької агрошколи проводили подібні дослідження ще в середині минулого сторіччя. При цьому дослідники прийшли до висновків, що курячий послід містив 10^{10} – 10^{11} колонієутворюючих мікроорганізмів в грамі посліду. На концентрацію КУО впливали свіжість посліду, його температура, вологість та рН. Переважно із посліду висівали коринєформні бактерії, спорадично зустрічалися мікрококи, у невеликих кількостях – нокардії, стрептоміцети, аеробні спороутворюючі мікроорганізми, а також стрептококи. Різноманіття грамнегативних бактерій залежала від мутності посліду, їх кількість зменшувалася в посліді з високим рівнем рН. В посліді з високим рівнем рН спостерігалася тенденція до зниження кількості грибів, але це не впливало на кількість ентерококів. (Schefferle, 1965).

Цікаві дані отримали вчені Scott A.Martin та Mark A.Mccann із Лабораторії птахівництва в Джорджії. Вони проводили дослідження з вивчення курячого посліду мікробіологічними та

фізико-хімічними методами. Дослідники прийшли до висновку, що послід із різних господарств містив малу кількість пліснявих грибів, при цьому їм вдалося виділити з деяких зразків *E.coli* 0157/H7 та *Salmonella* spp. Фізико-хімічними методами було встановлено, що усі зразки посліду були багаті поживними речовинами та містили Фосфор (2-3 %), Калій, Кальцій, Натрій, Алюміній, Залізо та золу (в середньому 30,4 %). Сирий протеїн у досліджуваних зразках був у 6 разів вищим за норму, а вологість у середньому складала 21,9 %. Це дало підстави стверджувати, що курячий послід є гарним середовищем для розвитку патогенної мікрофлори (Martin & McCann, 1998).

На дане ствердження також вказують результати досліджень вчених C.Dennis та Jennifer M.Gee. Вони провели мікологічні дослідження зразків посліду та змивів із пташників до та після утримання курей. Встановлено, що послід до його прибирання містив *Paecilomyces varioti*, *Trichoderma* spp., *Aureobasidium pullulans* та *Hyalodendron lignicola*. А після його прибирання з пташників із нього додатково виділяли *Scopulariopsis brevicaulis* та *Aspergillus* spp. Дослідниками встановлено, що джерелом контамінації посліду був пил із пташників (Dennis & Gee, 1973).

Слід зазначити, що такі органічні добрива як гній, послід, сидерати, стічні води тваринницьких господарств рекомендується щорічно вносити на поля для підтримання бездефіцитного балансу гумусу в ґрунті. Водночас, автори статті зазначають, що в зоні діяльності птахофабрик полігони відходів негативно впливають на стан флори і фауни, а також на здоров'я людини (Sharavev et al., 2013).

Інші автори також стверджують, що відходи тваринництва та птахівництва є головним компонентом для виробництва екологічно чистих та високоякісних органічних добрив. Проте, у свіжому вигляді використання посліду як органічного добрива, не рекомендується, тому що в перший рік це будо негативно впливати на навколишнє середовище і при розкладанні в ґрунті негативно впливати на ріст та розвиток рослин (Gurjanov et al., 2018).

До того ж, за даними мікробіологічних досліджень вчених Sharavev та Gurjanov ще раз підтверджується той факт, що свіжий послід містить велику кількість мікроорганізмів, в тому числі умовнопатогенні та патогенні, антропопатогенні серотипи кишкової палички, сальмонели. Також в ґрунті були виділені бактерії типу стафілококів (Sharavev et al., 2013; Gurjanov et al., 2018).

Ці дані свідчать про епізоотичну небезпеку посліду і про необхідність термічної обробки посліду при використанні в якості добрива (Neverova et al., 2014). Існують такі методи знезараження: біологічні (ґрунтовий, аеробне та анаеробне бродіння, біологічні ставки та ін.), хімічні та фізичні (термічний, електрогідралічний, електрофлотокоагуляція, токи високої частоти та опромінення). Дослідники зазначають, що існуючі методи знезараження мають недоліки, основними з яких є висока енергоємність процесу та наявність мертвих зон в органічній масі. Ними були проведені дослідження по знезараженню курячого посліду методом опромінення, а саме ультрафіолетовим та ультразвуковим.

Цей процес дає можливість знищити патогенну грибну мікрофлору, окрім грибів *Penicillium*. Вчені встановили, що ультрафіолетове та ультразвукове опромінення посліду курей є ефективним та екологічно безпечним методом знезараження (Gurjanov et al., 2018; 2019).

Є також рекомендації знезараження посліду від збудників інфекційних та інвазійних захворювань методами висушування, впливу високих температур та довготривалого компостування з різними субстратами. Але ці методи обробки посліду для перетворення його в органічне добриво мали і зворотній ефект: втрачалася цінність посліду як органічної речовини, що містить органічну масу, необхідну для трофіки біоти ґрунту та ферменти для розщеплення органічних речовин, які не розклалися в процесі травлення в шлунково-кишковому тракті птиці. Відомо наприклад, що із зернового корму в процесі травлення у птиці

засвоюється лише 15 % його вмісту, інше ж виводиться із послідом. Тому багато авторів і стверджують, що послід птиці має цінність без переробки (Sharavev et al., 2013).

Так, дослідники Neverova et al. вказують, що патогенні бактерії у свіжому посліді не можуть зберігатися та розмножуватися в ґрунтових умовах як невідповідних оптимального стану для життєдіяльності останніх. Швидкість вимирання залежить від інтенсивності забруднення ґрунтового шару, від властивостей ґрунту, від її кислотності, від погодних умов. Авторами статті запропонований пошук мікробіологічних комплексів для утилізації пташиного посліду без втрат його органічних і мінеральних речовин. Автори зазначають, що сучасні методи утилізації посліду включають послід в утворення компостів із стружкою, тирсою, корою, торфом та міськими відходами. При такому методі процес гуміфікації та мінералізації відбувається повільно (від 6 міс до 2-х років) із-за відсутності ферментів, що розкладають лігнін. Так як, в ШКТ птиці, і відповідно в їхньому посліді, відсутні ферменти, що руйнують лігнін. В природніх умовах розклад речовин, що містять лігнін (деревина) відбувається за рахунок ферментів грибів із класу базидіоміцетів. При цьому, результати досліджень авторів Neverova et al. вказують на те, що додавання екстрактів базидіоміцетів для активації процесу розкладу речовин, що містять лігнін, не мало позитивного ефекту. При цьому на думку авторів, в даному процесі не вистачає пектинази, яку, наприклад, виділяють такі бактерії як *Bacillus subtilis*. Для активної мінералізації деревини компосту необхідно створити комплекс специфічних мікроорганізмів (Neverova et al., 2014).

Важливо зазначити, що в пробах посліду не лише можна виділити мікроорганізми. Так, до 30-90% в незмінному вигляді виділяються із організму із екскрементами антибіотики, так як вони слабо адсорбуються в шлунково-кишковому тракті тварин.

В сільському господарстві гній традиційно використовується як органічне добриво, тому велика кількість антибіотиків можуть потрапити в ґрунт та інші компоненти навколишнього середовища. Крім того в навколишнє середовище потрапляють антибіотикорезистентні бактерії та гени стійкості, що сформувалися в ШКТ. Автори зазначають, що відходи тваринництва (гній, послід) одночасно можуть бути забруднені генами стійкості до декількох класів антибіотиків. В дослідженнях (Danilova et al., 2016) зазначено, що найбільше забруднені генами стійкості були зразки посліду від птиці.

Метою роботи було вивчення мікробіологічного складу посліду курей в птахогосподарствах України.

Матеріали і методи. Зразки курячого посліду (вагою 100 грам) для дослідження відбирали в птахогосподарствах різного масштабу та методу утримання птиці на території України, а саме: в Київській, Черкаській та Чернігівській областях (табл. 1). При цьому в кожному з господарств було відібрано по три зразки посліду з різних місць.

Таблиця 1

Місце та кількість відібраних зразків

Області	Кількість птахогосподарств	Кількість відібраних зразків
Київська	2	6
Черкаська	3	9
Чернігівська	1	3

Відібрані зразки транспортували в термоконтейнері за температури 2-8 °С. Отримані зразки досліджували мікробіологічно шляхом посіву на загально вживані (м'ясо-пептонний бульйон та агар (МПА та МПБ) і селективні середовища (MRS бульйон та агар). Інкубацію здійснювали за температури 37 °С протягом 18-24 годин.

Для визначення кількості спороутворюючої мікрофлори, досліджувані зразки у кількості 5 г поміщали в центрифужну пробірку та доводили до 50 см³ 0,9 % стерильним розчином натрію хлориду, струшували на шейкері та додавали 1-2 краплі Твін 80. Отриману суміш піддавали фільтрації через 4 шари марлі, а потім через фільтрувальний папір. Отриману

суспензію центрифугували протягом 15 хвилин при 3000 об/хв. Надосадову рідину зливали, залишаючи 5 см³ осаду. Даний осад висівали на МПА у матраці, а через 5 хв у ватно-марлеву пробку вводили 2 см³ скипидару та інкубували протягом 18-24 годин за температури 37 °С.

Морфологію виділених ізолятів вивчали шляхом мікроскопії мазків із добової бульйонної або агарової культур, зафарбованих за Грамом. Кислотоутворюючі властивості вивчали культивуючи виділені мікроорганізми за температури 37⁰С протягом 18-24 годин на агарі з додаванням карбонату кальцію. Каталазну активність вивчали за загальноприйнятою методикою з перекисом водню. Ферментативні властивості вивчали шляхом культивування отриманих ізолятів за температури 37 °С протягом 18-24 годин в рідкому індикаторному середовищі з додаванням різних цукрів, а саме: арабінози, целобіози, галактози, лактози, ксилози, мальтози, маніту, маннози, мелізітози, мелібіози, раффінози, рібози, саліцину, сахарози та сорбіту. Оцінку ступеню ферментації проводили візуально за системою чотирьох хрестів. Експериментальні дані обробляли методами варіаційної статистики за загально прийнятими методиками.

Результати й обговорення. В результаті проведених досліджень було встановлено, що в посліді курей, яких утримували в приміщенні відсоток спороутворюючих мікроорганізмів коливався в межах 14,74-21,24 %, а не спороутворюючих – 78,76-85,26 %. В посліді курей, що мали вигул, відсоток спороутворюючих мікроорганізмів коливався в межах 48,93-78,81 %, а не спороутворюючих – 21,19-51,07 % (табл. 2).

Таблиця 2

Співвідношення спороутворюючої та не спороутворюючої мікрофлори в посліді курей за різних умов утримання

Області	Номер господарства та тип утримання	Абсолютна кількість		Відсоткове значення	
		Спороутворююча мікрофлора	Не спороутворююча мікрофлора	Спороутворююча мікрофлора	Не спороутворююча мікрофлора
Київська	Господарство 1 Приміщення	$(8,9 \pm 0,3) \times 10^9$	$(3,3 \pm 0,8) \times 10^{10}$	21,24%	78,76%
	Господарство 2 Вигул	$(1,2 \pm 0,2) \times 10^{10}$	$(6,3 \pm 0,5) \times 10^9$	65,57%	34,43%
Черкаська	Господарство 1 Вигул	$(2,9 \pm 0,4) \times 10^{10}$	$(7,8 \pm 0,3) \times 10^9$	78,81%	21,19%
	Господарство 2 Приміщення	$(7,2 \pm 0,1) \times 10^8$	$(3,8 \pm 0,9) \times 10^9$	15,92%	84,08%
	Господарство 3 Приміщення	$(8,3 \pm 0,3) \times 10^9$	$(4,8 \pm 0,6) \times 10^{10}$	14,74%	85,26%
Чернігівська	Господарство 1 Вигул	$(9,2 \pm 0,7) \times 10^9$	$(9,6 \pm 0,4) \times 10^9$	48,93%	51,07%
Середнє				40,86%	59,14%

При цьому, середня кількість спороутворюючої мікрофлори за обох умов утримання склала 40,86 %, а не спороутворюючої – 59,14 %.

Наступним етапом наших досліджень було виділення мікроорганізмів *Lactobacillaceae spp.* із досліджуваних зразків. Всього, в середовищах MRS, було виділено 20 ізолятів, яких піддали дослідженню на предмет наявності кислотоутворюючих властивостей на агарі з додаванням карбонату кальцію. За результатами даних досліджень було встановлено, що лише три ізоляти мали виражені кислотоутворюючі властивості, що склало 15 % від загальної кількості виділених лактобактерій (табл. 3).

Результати виділення *Lactobacillaceae* spp. в досліджуваних зразках

Області	Номер господарства та тип утримання	Виділено <i>Lactobacillaceae</i> spp.	
		Всього	З кислотоутворюючими властивостями
Київська	Господарство 1, Приміщення	3	1
	Господарство 2, Вигул	4	0
Черкаська	Господарство 1, Вигул	4	1
	Господарство 2, Приміщення	3	0
	Господарство 3, Приміщення	3	0
Чернігівська	Господарство 1, Вигул	3	1
Всього		20	3

Подальше вивчення трьох ізолятів лактобактерій з кислотоутворюючими властивостями передбачало вивчення їх культуральних та морфологічних властивостей. На агарі MRS після 18-24 годин культивування, ізоляти мали вигляд маленьких, гладеньких біло-сірих колоній S-форми, що легко відділялися бактеріологічною петлею (рис.).

Рис. Ізолят № 3 на щільному поживному середовищі MRS.

В мазках добових культур, зафарбованих за Грамом, спостерігали невеличкі грампозитивні палички, що розташовувалися поодинокі, попарно, а також короткими ланцюжками. Ізоляти 1, 2 та 3 мали негативну реакцію на каталазу.

У результаті вивчення ферментативних властивостей встановлено, що ізолят 1 ферментував з утворенням кислоти без газу: галактозу, лактозу, мальтозу, маніт, мелібіозу, раффінозу, сахарозу та трегалозу. Не ферментував: арабінозу, целобіозу, ксилозу, маннозу, мелізітозу, рібозу, саліцин, сорбіт та ескулін. Ізолят 2 ферментував з утворенням кислоти без газу: арабінозу, галактозу, мальтозу, мелібіозу, раффінозу, рібозу та сахарозу. Не ферментував: целобіозу, лактозу, ксилозу, маніт, маннозу, мелізітозу, саліцин, сорбіт, трегалозу та ескулін. Ізолят 3 ферментував з утворенням кислоти без газу: маннозу та сахарозу, а також слабо мальтозу та трегалозу. При цьому не ферментував: арабінозу, целобіозу, галактозу, лактозу, ксилозу, маніт, мелізітозу, мелібіозу, раффінозу, рібозу, саліцин, сорбіт та ескулін (табл. 4).

Результати вивчення ферментативних властивостей

Цукри	Ізолят 1 саліваріус	Ізолят 2 Ройтері	Ізолят 3 Делбруекії
Арабіноза	-	++++	-
Целобіоза	-	-	-
Галактоза	++++	++++	-
Лактоза	++++	-	-
Ксилоза	-	-	-
Мальтоза	++++	++++	++
Маніт	++++	-	-
Манноза	-	-	++++
Мелізітоза	-	-	-
Мелібіоза	++++	++++	-
Раффіноза	++++	++++	-
Рібоза	-	++++	-
Саліцин	-	-	-
Сахароза	++++	++++	++++
Сорбіт	-	-	-
Трегалоза	++++	-	++
Ескулін	-	-	-

За результатами проведених досліджень, за допомогою визначника бактерій Берджі, ізолят 1 було ідентифіковано як *Lactobacillus salivarius subsp. salivarius*, ізолят 2 – *Lactobacillus reuteri*, а ізолят 3 – *Lactobacillus delbrueckii*.

ВИСНОВКИ

1. Таким чином, в результаті проведеної роботи було вивчено мікробіологічний склад посліду курей в птахогосподарствах України та виділено три ізоляти лактобактерій.

2. Послід курей, що утримували в приміщенні, містив 14,74-21,24 % спороутворюючих мікроорганізмів та, відповідно, 78,76-85,26 % не спороутворюючих. Послід курей, що мали вигул, містив 48,93-78,81 % спороутворюючих мікроорганізмів та 21,19-51,07 % не спороутворюючих мікроорганізмів.

3. Середня кількість спороутворюючої мікрофлори за обох умов утримання склала 40,86%, а не спороутворюючої – 59,14 %.

4. Виділено три кислотоутворюючі ізоляти лактобактерій, що ідентифіковано як: *Lactobacillus salivarius subsp. salivarius*, *Lactobacillus reuteri* та *Lactobacillus delbrueckii*.

Перспективи досліджень. Перспективним є подальше дослідження виділених лактобактерій для визначення їх деструктивної дії на курячий послід. Також необхідним вбачається подальше вивчення.

References

Danilova, N.V., Galickaja, P.Ju., Selivanovskaja, S.Ju. (2016). Multirezistentnost bakterij k veterinarnym antibiotikam v obrazcah navoza i pometa sel'skohozjajstvennyh zhivotnyh. Uchenye zapiski Kazanskogo universiteta. Serija estestvennye nauki. 158(4):507-16. [In Russian].

Dennis, C. & Gee, J.M. (1973). The Microbial Flora of Broiler-house Litter and Dust. Journal of General Microbiology. 78:101-7.

Gurjanov, D.V., Hmyrov, V.D., Papihin, R.V., Maslova, M.V. (2018). Obezrazhivanie kurinogo pometa ultrafioletovym oblucheniem. Agrarnyj nauchnyj zhurnal. 11:52-54. [In Russian].

- Gurjanov, D.V., Hmyrov, V.D., Papihin, R.V., Maslova, M.V. (2019). Obezrazhivanie kurinogo pometa ultrazvukovym oblucheniem. Agrarnyj nauchnyj zhurnal. 2:78-81. [In Russian].
- Martin, S.A. & Mccann, M.A. (1998). Microbiological survey of Georgia poultry litter. J. Appl. Poultry Res. 7:90-8.
- Neverova, O.P., Zueva, G.V., Sarapulova, T.V. (2014). Jekosistemnyj podhod k utilizacii pometa. Agrarnyj vestnik Urala. 8(126):38-41. [In Russian].
- Schefferle, H.E. (1965). The microbiology of built up poultry litter. J. Appl. Bact. 28(3): 403-11.
- Sharavev, P.V., Neverova, O P., Zueva, G.V., Romanova, A.S. (2013). Jekologicheskie osnovy pticevodstva. Agrarnyj vestnik Urala. 7(113):47-9. [In Russian].