

BIOTERMINIO BIOMASĖS APDOROJIMO ĮVERTINIMAS

Marija Stankevičienė, Henrikas Stankevičius, Violeta Baliukonienė, Bronius Bakutis

Lietuvos veterinarijos akademija, Tilžės g. 18, LT- 3022 Kaunas; tel. 8 37 36 31 43; el. paštas: marija@lva.lt

Santrauka. Tyrimų tikslas – išsiaiškinti, kokio efektyvumo (ypač mikrobiologiniu požiūriu) yra anaerobinis gyvulininkystės atliekų perdirbimo būdas Lietuvoje veikiančiame biodujų reaktoriuje ir kokios jo panaudojimo galimybės. Darbas, atliktas 2000–2002 metais, yra probleminis. Lietuvoje tokie tyrimai atliekami pirmą kartą. Tirta biodujų reaktoriaus įtaka darant skysto mėšlo ir srutų mikroorganizmus nekenksmingus. Atlikus tyrimus nustatyta, kad iš šulinio biomasės prieš apdorojant biomasę biotermiškai, inkubuojant +43° C temperatūroje, išskirtas *S. enteritidis* kamienas, po 45 dienų vėl išskirtas tas pats kamienas. Laboratorinėmis sąlygomis atlikus mikrobiologinius tyrimus nustatyta, kad biomasės nuotekose, apdorotose +50° C temperatūroje, aptikti salmoneliozės sukėlėjai, o salmonelės visiškai inaktyvuotos +70° C temperatūroje. Mikroskopinių grybų prieš bioterminį apdorojimą aptiktos 8 gentys, o apdorojus – 10 genčių, nes susidarė palankios sąlygos mikroskopiniams grybams daugintis (drėgmė ir palanki temperatūra). Biodujų reaktoriaus poveikis biomasei iš dalies leido nutraukti infekcinių ligų grandinę, o pagamintas dujas naudoti kaip energijos šaltinį gamybiniais poreikiais.

Raktažodžiai: biodujų reaktorius, biomasė, bakterijos, mikroskopiniai grybai, gamybos atliekos.

RATING OF BIOTHERMAL PROCESSING IN BIOMASS

Summary. The aim of the research was to explore the effectiveness of anaerobic method, especially in microbiological interest for disinfection of the waste of animal husbandry and possibilities of its usage in the active biological gas reactor in Lithuania.

The research conducted through the year 2000 – 2002 is relevant and newsworthy, because in Lithuania it was carried out the first time. The impact of biological gas reactor on the microorganisms' disinfection in liquid dung and manure was studied.

S. enteritidis genus was determined when the biomass had been taken from manhole before processing and incubated at +43 °C temperature. After 45 days *S. enteritidis* genus was distinguished repeatedly.

Microbiological analysis under laboratorial conditions showed *S. enteritidis* in the biomass, processed with the biogas reactor at +50 °C temperature; however, *Salmonella* microbes were inactivated completely in +70 °C temperature.

Because of favourable conditions for microfungi growing (humidity and proper temperature), 8 genres of microfungi before and 10 – after the biothermal processing were found.

The performance of biogas reactor on the biomass enables to break the chain of zygotic diseases to some extent and to use the produced gas as an energy source for industrial needs.

Keywords: biological gas (biogas) reactor, bacteria, parasites, microfungi.

Įvadas. Lietuva yra žemės ūkio šalis. Čia pakankamai gerai plėtojama gyvulininkystė. Auginant gyvulius susikaupia nemažai skysto mėšlo ir srutų, ypač stambiose kiaulių fermose, todėl iškyla mėšlo tvarkymo problema. Žinomos įvairios mėšlo tvarkymo technologijos ir būdai, kaip mėšlą padaryti nekenksmingą. Vieną tokių nagrinėsime savo darbe.

Skystas mėšlas ir srutos yra užkrėsti daugybe įvairiausių mikroorganizmų, mikroskopinių grybų, helmintų kiaušinėlių. Paskleidus tokias neapdorotas organines trąšas, į aplinką patenka mikroorganizmai, tarp kurių dažnai pasitaiko patogeniškų aplinkos biofaunai, į dirvožemį ir vandenį patekę nitratai bei fosfatai, nuodingosios dujos, kaip amoniakas, aplinką veikia neigiamai. Priklausomai nuo aplinkos veiksnių, kai kurių mikroorganizmų patogeniškumas gali išsilaikyti gana ilgai. Vienas iš rizikos veiksnių mažinimo būdų – anaerobiškai skystą mėšlą ir srutas padaryti nekenksmingus. Tai dažniausiai atliekama biodujų reaktoriuose. Nors ekonominiu požiūriu toks procesas brangiai kainuoja, tačiau ekologiškai labai svarbus. Perdirbtas skystas mėšlas gali būti naudojamas kaip organinė trąša, o biodujos naudojamos kaip papildomas

energijos šaltinis (Barth, 1985). Be to, kad efektyviau veiktų biodujų reaktoriai ir juose greičiau vyktų fermentacijos procesai, į bendrą mėšlo ir srutų masę primaišoma aliejaus gamybos, skerdyklų, odų, maisto pramonės ir kitokių atliekų. Taigi atsiranda papildomų rizikos veiksnių, nes su naujais komponentais galima įnešti naujų patogeninių mikroorganizmų (Strauch, 1989). Veterinarijos sanitariniu požiūriu labai svarbu, kokia mikroflora tose atliekose vyrauja, ypač gyvulinės kilmės. Virusai, bakterijos, parazitai ir mikroskopiniai grybai mėšle bei šlapime gali išsilaikyti ilgą laiką ir žemoje temperatūroje (Bendixen, 1990; John et al., 1994). Jeigu skerdyklų atliekos, mėšlas neapdorojami, tai laukiniai paukščiai, žiurkės, vabzdžiai vėl užkrečia gyvulių pašarą ir pačius gyvulius. Norint nutraukti šią grandinę, reikia mėšlą apdoroti. Kliniškai sveiki gyvuliai gali būti patogenų – virusų, bakterijų ir parazitų nešiotojai, nes persistuojantys patogenai įvairiuose audiniuose gali būti platinami su skerdyklų atliekomis (Notermans et al., 1986).

Iš dalies skystas mėšlas ir srutos padaromi nekenksmingi anaerobiniu būdu. Anaerobinio proceso bakteriocidinį efektą tyrė daugelis mokslininkų (Botuer,

1990; Ruckert, 1991; Silvers, 1991; Larsen et al., 1992; Kearney et al., 1993; Grunvald, 1995; Paluszak, 1996; Plym Forshal, Eskesbo, 1996). Jie tyrinėjo dažniausiai laboratorinėmis sąlygomis ir tik atskirais atvejais pasinaudojo gamybinėmis sąlygomis veikiančiais biudųjų reaktoriais.

Organines išmatų ir kitų gyvulininkystės atliekų medžiagas skaldo trys bakterijų tipai – aerobiniai, anaerobiniai ir fakultatyviniai anaerobai. Bakterijų tipas ir mėšlo tvarkymo būdas gali veikti teršalų skaidymosi greitį bei nemalonių kvapų atsiradimą (Jacques, 1988).

Mikrobams skaidant išmatų aminorūgštis ir šlapime esančius sulfatus, išsiskiria sieros turinčios lakiosios medžiagos. Tačiau mėšle greitai susidaro anaerobinės sąlygos, ir mikrobiniai procesai lėtėja (Асонов, 1989), todėl atsiranda įvairūs ne visai suskilę produktai – amoniakas, sieros vandenilis, mono-, di- ir trimetilaminas, metilmerkaptanas, indolas, skatolas ir dar kelios dešimtys junginių.

Daugelis mokslininkų tyrinėjo, kokie mikroorganizmai egzistuoja biomasėje. Danijos specialistų tyrimais, mėšle nuolat esti šie mikroorganizmai: *Salmonella dublin*, *Salmonella typhimurium* ir kitos, *Mycobacterium paratuberculosis*, *Escherichia coli*, *Treponema hyodysenteriae*, *Clostridium perfringens*, *Erysipelotrix rhusiopathiae*, *Listeria monocytogenes*; virusai *rotovirus*, *coronavirus*, *parvovirus*; parazitai *Ascaris suum*, *Trichostrongylidae*, *Dictiocaulus viviparus*, *Cocidia*, *Fasciola hepatica*; mikroskopiniai grybai *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*. Tyrimai atlikti laboratorinėmis ir gamybinėmis sąlygomis.

Gerai žinoma, kad biomasėje yra patogeninių bakterijų: *Salmonella*, *Listeria*, *Echerichia coli*, *Campylobacter*, *Mycobacteria*, *Clostridia* ir *Yersinia* (Dudley et al., 1980; Strauch, 1991; Larsen, 1995). Daugelis jų yra zoonoziniai patogenai, galintys sukelti infekcijas tiek žmonėms, tiek gyvuliams. Be to, kai kurios šių bakterijų yra labai atsparios ir puikiai gali daugintis biomasėje.

Salmonella – viena iš plačiausiai biomasėje išplitusių patogenų. Visi salmonelių serotipai yra potencialiai patogeniški žmonėms ir gyvuliams. Šiuo metu žinomos 52 salmonelių serologinės grupės, kurių sudėtyje yra daugiau kaip 2000 serologinių kamienų. Jie skiriasi antigenine struktūra, biocheminiu ir fermentiniu aktyvumu. Salmonelėms ūkiuose išplisti padeda salmonelėmis užkrėsti pašarai, didėjantis subklinikinį ir latentinių salmoneliozių skaičius gyvulių tarpe (Opara et al., 1992; Liuksemburg, Stanevičius, 1994). Jos ilgai išsilaiko dirvoje, srutose, gyvulių lavonuose ir fekalijose. Srutose salmonelės gali gyvuoti ilgiau nei 77 dienas (Steinbah, 1993). Maksimali temperatūra, kurioje gali daugintis 5 - 47° C (Backer, 1987). Kiaulių salmoneliozes sukelia įvairių serologinių kamienų salmonelės. Literatūroje dažniausiai aprašomi *Salmonella choleraesuis* ir *Salmonella typhimurium* kamienai (Steinbah et al., 1993; Srainand et al., 1995).

Listeria monocytogenes randama dirvožemyje, silose, išmatose ir eksudatuose. Ši bakterija gali sukelti įvairius

klinikinius negalavimus, įskaitant abortus žmonėms ir atrajotojams. *L. monocytogenes* gali daugintis ir likti patogeniška 1 – 45° C temperatūroje. J. R. Junttila ir kiti mokslininkai nustatė (1988), kad srutose esanti *L. monocytogenes* gali sukelti listeriozę.

E. coli O157 gamina verotoksina ir yra svarbiausias maisto patogenas, žmonėms sukeliantis kolitą ir hemoraginę uremiją. Pagrindinis *E. coli* O157 rezervuaras yra galvijai (Dorn, 1993; Kudva et al., 1998). G. Wang ir kiti tyrėjai nustatė (1996), kad *E. coli* O157:H7 galvijų išmatose išlieka gyvybinga 22–37° C temperatūroje 10 savaičių ir 10 savaičių gali gaminti verotoksina.

Mycobacterium paratuberculosis – plačiai išplitusi bakterija, atrajotojams sukelianti chronišką enteritą. Ji labai atspari aplinkos veiksniams (Hirsh et al., 1999). Tokioje šalyse kaip Australija, Norvegija ir Švedija yra parengti nacionaliniai *M. paratuberculosis* išnaikinimo planai. Šiose šalyse gyvuliai, infekuoti *M. paratuberculosis*, skerdziami, o bandos sertifikuojamos, jei neaptikamas *M. paratuberculosis* sukėlėjas.

Campylobacter gana jautrus anaerobiniam apdorėjimui. Aplinkoje bakterija gyvena trumpai ir didelio pavojaus nekelia (Stampi et al., 1998/1999).

Clostridium spp. – viena iš sporas gaminančių bakterijų, labai atspari. Aplinkoje sporas gali išsilaikyti daugelį metų. Ši bakterija sukelia pūtimą, botulizmą ir „juodųjų kojų“ ligą. *Clostridium tyrobutyricum* padaro didelius ekonominius nuostolius pieno pramonėje, ypač sūrių gamyboje (Dasgupta et al., 1989). Silosas, kuriame aptinkama daugybė sporų, yra pagrindinis užkrato šaltinis.

Yersinia spp. a gali augti 0° C temperatūroje ir siejama su vandeniu (Holt et al., 1994). Dažnai išskiriama iš skerdyklų atliekų (Hartung, Gerigk, 1991).

Daug anaerobinio apdorėjimo tyrinėjimų atlikta laboratorinėmis sąlygomis. Laboratorijoje technologiniai parametrai lengvai išlaikomi, tačiau patogenus sunaikinti ir išvengti rekontaminacijos gamyboje sunku. Deja, palyginti su laboratoriniais daug atsparių bakterijų randama apdorojus gamybiniuose reaktoriuose (Carrington et al., 1982). Nesočiųjų riebalų rūgščių (NRR) kiekis ir pH koreliuoja bakterijų dauginimąsi biomasėje anaerobinio apdorėjimo metu (Farrar et al., 1983). Šių rūgščių toksiškumas priklauso nuo biomasės pH. D. P. Henry, A. J. Frost ir kiti mokslininkai pastebėjo (1983), kad NRR toksiškumas *S. typhimurium* yra daug didesnis ir kai kurios anaerobinės bakterijos slopina salmonelių dauginimąsi. T. E. Kearney, M. J. Larkin ir kiti tyrėjai (1993) teigia, kad sutrumpintas bioterminis ciklas skirtingai veikia atskirų bakterijų medžiagų apykaitą. *C. jejuni* naudoja aminorūgštis ir vitaminus, kurių nenaudoja *S. typhimurium*.

Kai kurių patogeninių bakterijų biomasėje yra nedaug, todėl jas sunkiau nustatyti. Bakterijos yra indikatoriai, naudojami žarnyno patogenams aptikti ir bioterminio apdorėjimo efektyvumui nustatyti. Šios bakterijos nėra patogenai, o didelis jų kiekis yra žmonių ir gyvulių žarnyne. Parenkant bakteriją – indikatorių yra du pagrindiniai reikalavimai: pirma, didelis šių bakterijų kiekis turi būti išskiriamas su išmatomis; antra, bakterijos turi būti lengvai išskiriamos ir suskaičiuojamos (Bitton,

1999). Enterokokai – tinkamiausia bakterija – indikatorius biomasės apdorojimo efektyvumui bioreaktoriuose nustatyti (Larsen et al., 1994). Gentis *Enterococcus*, vadinamieji fekaliniai sterptokokai (FS), susideda iš *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus avium* ir *Enterococcus galinarius* (Holt et al., 1994). Danijoje vadinamasis FS metodas taikomas apdorotos biomasės kokybiniam patikimumui įvertinti apimant bendrai esančius patogenus *Salmonella*, *Listeria*, *Campylobacter* ir *Yersinia* (Espensen, 1996). Tačiau FS metodas yra apribotas temperatūros režimo – kai ciklo metu temperatūra siekia +55° C, FS greitai inaktyvuojami (Bendixen, Ammendrup, 1992).

Taigi anaerobinis gyvulininkystės atliekų perdirbimo būdas labai aktualus mikrobiologiniu, mikologiniu ir parazitologiniu požiūriu, nes tręšiant dirvą apdorota biomase iš dalies nauji patogeniniai mikroorganizmai nepatenka. Žemės ūkiui, gaminančiam žaliavas perdirbamajai pramonei, svarbu pateikti geros kokybės žaliavas. Vartotojas turi būti apsaugotas nuo susirgimų.

Pastaruoju metu Lietuvoje mikroskopinių grybų įvairovė pastebimai pagausėjo, nes padažnėjo žmonių migracija, padaugėjo maisto, pašarų ir žemės ūkio produktų, suaktyvėjo prekių importas. Lietuvos klimatinėmis sąlygomis plačiausiai išplitę *Penicillium* ir *Aspergillus* genčių mikroskopiniai grybai. Vien tik *Penicillium* genties grybų identifiukuota per 100 rūšių. Funkcionuodami jie išskiria metabolitus (Scott, 1994). Mūsų klimatinėmis sąlygomis daug *Stachybotrys* genties mikroskopinių grybų yra ant augalinių liekanų, ypač ant laukuose paliktų žiemoti šiaudų. Nustatyta, kad atskiros mikroskopinių grybų rūšys gali prisitaikyti prie įvairių augalų. Ant nupjauto ankštinių ir varpinių žolių šieno, ypač ilgiau pagulėjusio ant drėgnos žemės, gausiai aptinkami toksinus gaminančių mikroskopinių grybų atstovai iš *Penicillium*, *Alternaria*, *Paecilomices*, *Gliocladium*, *Cladosporium*, *Fusarium* genčių (Niyo et al., 1989; Lugauskas, Krikštaponis 1995; Lugauskas, 1997; Banks, 1999).

Šiuo metu žinoma per 300 mikroskopinių grybų rūšių, kurie augdami ant įvairių maisto produktų arba jų žaliavų gamina daugiau kaip 200 įvairių mikotoksinių medžiagų, turinčių mutageninių, teratogeninių, kancerogeninių ir kitų žalingų savybių. Dažniausiai Lietuvoje pasitaiko šie: aflatoksinai - difuranokumarino dariniai, pavojingiausi žmogui ir gyvūnams, priklausantys vėžį sukeliančių medžiagų grupei, ypač pažeidžia kepenis. Juos gamina daugiausiai dvi pelėsių rūšys – *Aspergillus flavus* ir *Aspergillus parasiticus* (Smith et al., 1994); zearalenonas – makrociklinis beta rezorcilo rūgšties laktonas, išskiriamas *Fusarium geraminearum*, *Fusarium grookwellense*, *Fusarium culmorum* ir *Fusarium semitectum* pelėsių. Jis aptinkamas kviečiuose, miežiuose, o ypač kukurūzuose. Malant grūdus, zearalenonas koncentruojasi sėlenose. Manoma, kad iš pašarų jis nepereina į pieną. Zearalenonas nėra labai toksiškas. Ochratoksinas pirmą kartą buvo išskirtas iš pelėsių *Aspergillus ochraceus*, tačiau vėlesni tyrimai parodė, kad ir kiti mikroskopinių grybų *Aspergillus* ir *Penicillium* rūšių atstovai gali gaminti ochratoksiną A. Šie mikroskopiniai grybai geriausiai auga ant grūdinių

kultūrų, blogai grūdus sandėliuojant gali patekti gyvuliams su pašaru. Ochratoksinai dažniausiai pažeidžia inkstus bei kitus svarbius gyvybinius organus (Smith et al., 1994).

Situacija Lietuvoje reikalauja išsiaiškinti bekrakių laikymo sistemų veiksmingumą ir pasiūlyti tinkamiausią technologinį mėšlo apdorojimą.

Darbo tikslas – išsiaiškinti, kiek paveikus Lietuvoje anaerobinis gyvulininkystės biomasės kenksmingumo šalinimo būdas veikiančiame biodujų reaktoriuje ir kokios to būdo pritaikymo galimybės.

Tyrimų metodai ir sąlygos. Darbas atliktas 2000-2002 metais Lietuvos veterinarijos akademijoje, UAB „Vyčia“ ir Lietuvos žemės ūkio universitete. Tyrimų objektas – iš salmonelių nešiotųjų išeinamosios žarnos paimtų išmatų, gamybinių atliekų ir biodujų reaktoriuje esančios biomasės 75 mėginiai.

Mikrobiologiniai tyrimai atlikti pagal Hohenheimo universiteto Gyvulių ir aplinkos higienos instituto modifikuotą metodiką (Bohm, 1995). Salmonelių pirminiam neselektyviam gausinimui 50 g biomasės sėta į buferinę peptono vandens terpę santykiu 1:10. Terpė inkubuota +37° C temperatūroje 24 valandas. Selektyviam gausinti naudota Rappaport-Vassiliadis (RV) terpė. 0,1 ml užkrėstos pirminio gausinimo terpės sėta į 10 ml RV terpės ir inkubuota +37° C ir +43° C temperatūroje 24 valandas. Grynai salmonelių kultūrai išskirti iš kiekvienos gausinimo terpės sėta ant standžių diferencinių terpių: brilianto žaliojo agarų, XLD ir standartinio agarų.

Bendram bakterijų skaičiui nustatyti 20 g biomasės įdėta į 0,9 % fiziologinio tirpalo, kad skiedinys būtų 1:10. Taip paruoštas parą šaltoje patalpoje maišomas ant kratyklės. Po paros iš 3–4 paskutinių fiziologiniame tirpale skiedinių atlikti trys lygiagretūs sėjimai po 0,1 ml ant standartinio agarų. Inkubavus +37° C temperatūroje 24 valandas, po to suskaičiuotos išaugusios bakterijų kolonijos.

Fekaliniam streptokokams nustatyti 20 g biomasės įdėta į 0,9 % fiziologinio tirpalo, kad skiedinys būtų 1:10. Taip paruoštas parą šaltoje patalpoje, maišomas ant kratyklės. Po paros paruošti trys lygiagretūs skiediniai fiziologiniame tirpale iki 10⁻¹². Iš paruoštų skiedinių po 1 ml pernešta į tris azido ir gliukozės terpės mėgintuvėlius. Inkubuota +37° C temperatūroje 48 valandas. Iš pasirinktųjų lygiagrečių skiedinių kilpele sėta į kanamicino agarą. Inkubuota +37° C temperatūroje 24 arba 48 valandas ir įvertinta.

Kolibakterijos ir enterobakterijos nustatytos kaip ir fekaliniai streptokokai, tik naudotos kitos terpės: MacConkey sultinys ir diferenciniai agarai – Endo, Teriglot, MacConkey.

Listeria spp. nustatyti 25 gramai biomasės įnešta į 225 ml listerijų gausinimo sultinį, homogenizuota 2 min. Po to inkubuota +30° C temperatūroje 24 arba 48 valandas. Gauta mikoorganizmų suspensija užsėta vienkartinė 10 μl kilpele ant standžios listerijoms išskirti terpės. Inkubuojama +30° C temperatūroje 24 arba 48 valandas. Atrinkamos lėkštelės su tipiškėmis kolonijomis. Patvirtinta, jog išskirta *Listeria spp.* biocheminiais testais arba naudojant komercinius rinkinius.

Mikologiniam tyrimui imta 10 g biomasės ir darytas skiedinys 1:10. Toliau 1 ml skiedinio pilta į 9 ml sterilaus vandens ir taip skiesta iki $1 \cdot 10^{-3}$. Sporų kiekis nustatytas sėjant 1 ml skiedinio į Petri lėkšteles su Čapeko terpe aprašytu metodu (Курасова и др., 1971).

Duomenims grafiškai pateikti naudota „Microsoft Excel 7,0“ programa.

Tyrimo rezultatai. Patogenai *E. coli*, *Salmonella*, *Listeria*, mikroskopiniai grybai bei parazitų kiaušinėliai į aplinką gali patekti tiesiogiai su infekuotų gyvulių išmatomis, tręšiant mėšlu, srutomis ar netinkamai darant nekenksmingas skerdyklų ir maisto pramonės įmonių atliekas. Tirtas kiaulių komplekse įrengtas danų pagamintas biodujų reaktoriaus poveikis biomasei. Mėginiai tyrimams buvo imami iš šulinio biomasei patenkant į reaktorių ir iš šulinio, kai biomasė praeina reaktorių. Atlikus tyrimą nustatyta, kad abiejuose mėginiuose, inkubuojant $+43^{\circ}\text{C}$ temperatūroje, išskirtas *S. enteritidis* kamienas. Pakartotinai atlikus tyrimą, po 45 dienų inkubuojant $+43^{\circ}\text{C}$ temperatūroje iš šulinio prieš bioterminiškai biomasę apdorojant vėl išskirtas *S. enteritidis* kamienas.

Norėdami išsiaiškinti, ar tarp ūkio kiaulių cirkuliuoja šis kamienas, atlikome salmonelių nešiotųjų tyrimą iš išeinamosios žarnos paimtų išmatų: 10 d. paršelių; 30–60 d. paršelių; 60–90 d. nujunkytų paršelių; 180–200 d. Penimų ir paršavedžių. Salmonelių nešiotųjų neaptikome.

Norėdami nustatyti, kaip patogeninė mikroflora patenka į mėšlo rezervuarus, mėginius ėmėme iš atvežtų gamybos perdirbimo atliekų. Gyvūninės kilmės atliekų patogeninių mikroorganizmų neišskirta. 2002 metais mikrobiologinis biomasės tyrimas buvo tęsiamas laboratorinėmis sąlygomis. Norėta išsiaiškinti temperatūros režimo poveikį biomasėje esančiai mikroflorai. Norėdami išsiaiškinti, per kiek laiko biomasėje inaktyvuojami patogenai, tyrimus atlikome atitinkamam temperatūros režimu su žinomais patogenais (1 lentelė).

Tyrimas buvo atliekamas iki 7 parų, mėginiai imti du kartus per parą tuo pačiu laiku. Iš gautų tyrimo rezultatų matyti, kad salmonelės reaktoriuje išliko gyvybingos tris paras, ketvirtą parą ir vėliau salmonelių mėginiuose neaptikta.

1 lentelė. Biomasės apdorojimas mezofiliniu būdu

Mėginių ėmimo laikas	„X“ patogeno nustatymas	Temperatūra technologinio ciklo metu, $^{\circ}\text{C}$
1 para	Auga <i>S. enteritidis</i>	+38,5 — +39,5
2 para	Auga <i>S. enteritidis</i>	+38,5 — +39,5
3 para	Auga <i>S. enteritidis</i>	+38,5 — +39,5
4 para	Salmonelės neaptiktos	+38,5 — +39,5
5 para	Salmonelės neaptiktos	+38,5 — +39,5
6 para	Salmonelės neaptiktos	+38,5 — +39,5

Toliau tyrimą tęsėme biomasę apdorodami termofiliniu būdu. Temperatūros režimas buvo $+50^{\circ}\text{C}$, $+55^{\circ}\text{C}$, $+60^{\circ}\text{C}$, $+70^{\circ}\text{C}$ (2, 3 lentelės). Du žinomi dviejų parų patogenai buvo įdėti į mėšlo masę, kurios pradinė temperatūra $+19,8^{\circ}\text{C}$ (1 mėginys). Tada temperatūra pakelta iki $+50^{\circ}\text{C}$ ir tuoj pat imtas antras mėginys. Taip kas 30 minučių tris valandas. Bakterijų irimo greitis priklauso nuo daugelio veiksnių: temperatūros, apdorojimo trukmės, pH, NRR kaitos, maišymo ar ciklo, bakterijų rūšies ir turimos medžiagos (Farrah et al., 1983; Larsen, 1995). Patogenų inaktyvacija taip pat priklauso nuo pradinio patogenų kiekio biomasėje (Strauch, 1991). Temperatūros ir jos išlaikymo trukmės veiksniai yra pagrindiniai kontrolės punktai apdorojant biomasę. Anaerobinis apdorojimas atliekamas tiek mezofiliniu, tiek termofiliniu būdu. Bioreaktoriuje visas substratas paduodamas tuo pačiu laiku, išskyrus 10 % šviežio substrato, kuriuo papildomas reaktorių (Wellinger, 2000). Visa sistema veikia nepertraukiamai. Austrijoje, Olandijoje, Vokietijoje ir Švedijoje bioreaktoriai turi pasterizacijos pakopą, kurioje substratas prieš anaerobiškai apdorojant 30 – 60 min. kaitinamas iki 70°C temperatūros (Albihn et al., 1999; Colleran, 2000).

2 lentelė. Biomasės termofilinio apdorojimo rezultatai 50°C ir 55°C temperatūroje

	Mėginys	Patogenų nustatymas		Mėginys	Patogenų nustatymas
	50°C	1		Auga <i>S. enteritidis</i> Auga <i>E. coli</i>	55°C
2		Auga <i>S. enteritidis</i> Auga <i>E. coli</i>	2	Neauga	
3		Auga <i>S. enteritidis</i> Auga <i>E. coli</i>	3	Neauga	
4		Neauga	4	Neauga	
5		Neauga	5	Neauga	
6		Neauga	6	Neauga	
7		Neauga	7	Neauga	
8		Neauga	8	Neauga	

Pastaba: atliekant bandymą $+55^{\circ}\text{C}$ temperatūroje, biomasė su užkratu buvo pakaitinta iki $+52^{\circ}\text{C}$ temperatūros ir užpildytas laboratorinis reaktorių. Tolimesnio tyrimo eiga analogiška kaip ir $+50^{\circ}\text{C}$ temperatūroje

3 lentelė. Biomės termofilinio apdorojimo rezultatai 60° C ir 70° C temperatūroje

	Mėginys		Patogenų nustatymas	
	1	2	1	2
60° C	1	2	Auga <i>S. enteritidis</i> Auga <i>E. coli</i>	Neauga
	2	3	Neauga	Neauga
	3	4	Neauga	Neauga
	4	5	Neauga	Neauga
	5	6	Neauga	Neauga
	6	7	Neauga	Neauga
	7	8	Neauga	Neauga
	8		Neauga	Neauga

Pastaba: atliekant bandymą + 60° C temperatūroje, pradinė biomasė su užkratu temperatūra +29,2° C (1 mėginys)

Tirdami biomasę +50° C temperatūroje, patogenus aptikome praėjus 1 valandos termofiliniam ciklui. Apdorojant biomasę +55° C, +60° C, +70° C temperatūroje, patogenai neaugo. 3 lentelėje matome, kad patogenai buvo aptikti tik pirmame mėginyje. Kituose biomasės mėginiuose patogenų neaptikome. Visus bandymus atlikome du kartus.

Kadangi į pašarus gali patekti įvairių mikroskopinių grybų pradai, būtina atkreipti dėmesį į plačiai Lietuvoje paplitusius *Penicillium* ir *Aspergillus* genčių mikroskopinius grybus, nes jie per virškinamąjį traktą su išmatomis gali vėl patekti į aplinką. Tada norėjome išsiaiškinti, kokie mikroskopiniai grybai vyrauja biomasėje, kokį poveikį jiems daro bioterminis anaerobinis apdorojimas. Mėginiai buvo imami kas mėnesį prieš bioterminį apdorojimą ir biotermiškai apdorojus. Nustatėme, kad tirtoje biomasėje vyrauja šių genčių mikroskopiniai grybai: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Trichoderma*, *Scopulariopsis*, *Gilmaniella* ir kt.

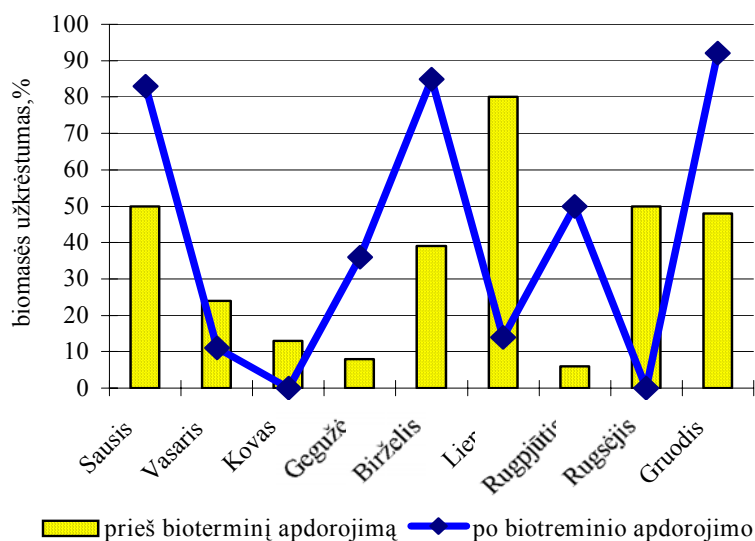
Biomasėje prieš bioterminį apdorojimą aptiktos aštuonios mikroskopinių grybų gentys. Vyraavo *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium*, *Mucor*.

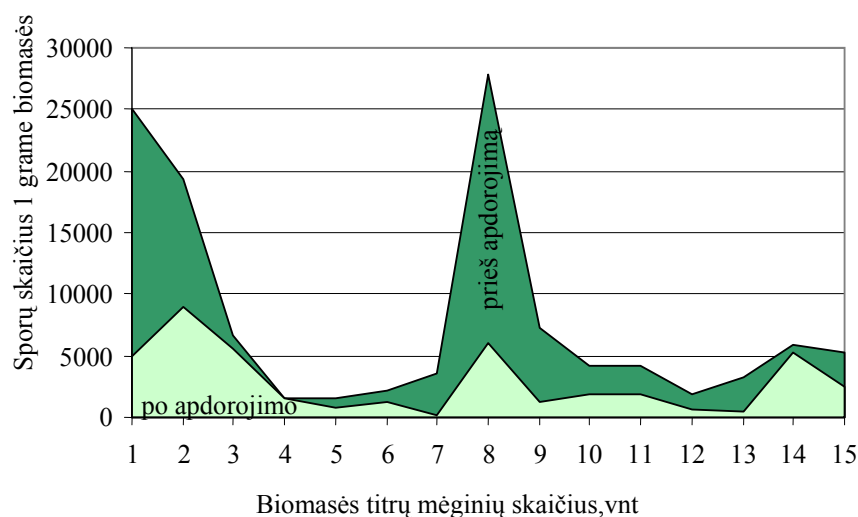
Biotermiškai apdorojus biomasę mikroskopinių grybų genčių santykis nežymiai pasikeitė – nustatyta dviem gentimis daugiau nei prieš bioterminį apdorojimą. Apdorojimas žymiai pakeitė mikroskopinių grybų

procentinį santykį. Rugsėjo mėnesio bandymuose pagal procentinį užkrėstumą prieš bioterminį apdorojimą vyravo *Aspergillus fumigatus* gentis (50 %), o *Penicillium* genties mikroskopinių grybų sporų neaptikta. Po bioterminio apdorojimo vyraujanti gentis buvo *Penicillium* (50 %), o *Aspergillus fumigatus* gentis neaptikta.

Nagrinėdami atskirų mikroskopinių grybų genčių jautrumą mezofiliniam biomasės apdorojimui pastebėjome, kad jautrumo dinamika nepastovi. *Aspergillus fumigatus* mezofiliškai apdorojus buvo visiškai inaktyvuotas tik rugsėjį ir kovą tirtuose mėginiuose (1 pav.). Sausio, gruodžio ir birželio mėnesį tirtuose biomasės mėginiuose mezofiliškai apdorojus *Aspergillus fumigatus* buvo aptikta du kartus daugiau nei prieš apdorojimą. Galima teigti, kad biomasės mezofilinis apdorojimas mikroskopinių grybų nesunaikina, o kai kurių aktyvumas dar padidėja dėl tinkamų dauginimosi sąlygų.

Literatūros duomenimis, mezofilinis biomasės apdorojimas bakterijų sporų nesunaikina (Albihn et al., 1999). Mes nagrinėjome, kaip mezofilinis apdorojimas veikia mikroskopinių grybų sporas. 2 pav. parodo, kad apdorotoje biomasėje mikroskopinių grybų sporų aptinkama visai nemažai. Rekontaminacija mikroskopiniais grybais galima ir biomasę apdorojus mezofiliškai.

1 pav. *Aspergillus fumigatus* dinamika



2 pav. Mikroskopinių grybų sporų skaičius

Rezultatų aptarimas. Tyrimų duomenys parodė, kad gamybiniame reaktoriuje mėšlas biotermiškai apdorojimas nepakankamai aukštoje temperatūroje: išlieka bakterijos ir mikroskopiniai grybai, kai kurie karščiui atsparūs virusai (parvovirusai) ir prionai (Bendixen et al., 1995). Norint biomasėje nutraukti patogeninės mikrofloros grandinę, reikėtų keisti temperatūros režimą. Temperatūra – svarbiausias anaerobinio apdorojimo veiksnys. (Dumontet et al., 1999). Apdoroti galima mezofiliniu būdu 30-38° C temperatūroje arba termofiliniu 50-55° C temperatūroje. Bakterijų inaktyvacija priklauso nuo temperatūros režimo trukmės. Esant aukštesnei temperatūrai bakterijų inaktyvacijai reikia mažiau laiko. Apdorojant termofiliniu būdu, *Salmonella* ir *M. paratuberculosis* inaktyvuojamos per 24 val. (Plym Forshell, 1995). Tačiau *B. cereus* ir *Cl. perfringens* sporų nei mezofiliniu, nei termofiliniu būdu kenksmingumas nepašalinamas. Pasterizacija yra vienas iš efektyviausių būdų iš esmės sunaikinant patogenus, kaip antai *Salmonella* sunaikinama per 5 minutes pakaitinus biomasę +70° C temperatūroje (Mitscherlich et al., 1984). Tačiau bakterijų sporos pasterizuojant nesunyksa. Švedijoje biomasė kaitinama +70° C temperatūroje 60 min., tada paduodama į bioreaktorių (Albihn et al., 1999). Danijoje pasterizacija atliekama tuo pačiu metodu, tik žemesnėje temperatūroje ilgesnį laiką – taip derinamas termofilinio ir mezofilinio apdorojimo būdas (Bendixen, 1999). Vokietijoje ir Austrijoje pasterizacija atliekama taip: prieš mezofilinį apdorojimą biomasė kaitinama +70° C temperatūroje 60 min., o prieš termofilinį – 70° C temperatūroje 30 min. (Colleran, 2000).

Ekonominiu požiūriu, pasterizacija apdorojus biomasę anaerobiškai galėtų būti efektyvesnė nei pasterizacija prieš biomasės apdorojimą. Tačiau Šveicarijoje taikant šį biomasės apdorojimo ciklą patogenai vėl išaugo (Keller, 1983). Pasterizacija biotermiškai apdorojus skatina biomasės rekontaminaciją. Dėl šios priežasties biomasę padaryti nekenksmingą geriausia prieš dorojant biotermiškai. Laboratoriniais reaktoriais įrodyta, kad *Salmonella* ir žarnyno koliforminės bakterijos neatgyja, jeigu biomasė efektyviai pasterizuota +70° C

temperatūroje 30 min. Deja, pasterizavus gamybinėmis sąlygomis rekontaminacija įvyksta. (Bagge, 2001). Mūsų atliktų tyrimų rezultatais nustatyta, kad laboratorinėmis sąlygomis pakėlus temperatūrą daugiau nei +55° C salmonelių nerandama.

Mikroskopiniai grybai, kurių visada gausu aplinkoje, ima plisti kai tik susidaro palankios temperatūros ir drėgmės sąlygos. Šie du veiksniai skatina jų vystymąsi ant grūdų. Jei gyvuliai šeriami užkrėstais pašarais, su jų išmatomis į aplinką patenka mikroskopiniai grybai. Manoma, kad jie yra aerobai, tačiau pastaruoju metu nustatyta, kad mikroskopiniai grybai gali augti net anaerobinėmis sąlygomis. Tyrimų duomenų apie juos prieš ir po biomasės apdorojimo dujų bioreaktoriuje radome nedaug. Pagal Danijos specialistų atliktus tyrimus mėšle nuolat randami *Aspergillus*, *Penicillium* ir *Fusarium* mikroskopiniai grybai. Tyrimai atlikti laboratorinėmis ir gamybinėmis sąlygomis.

Tyrimais nustatėme, kad biomasėje prieš bioterminį apdorojimą aptiktos aštuonios mikroskopinių grybų gentys. Pagal procentinį santykį vyravo *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium* ir *Mucor*. Biotermiškai apdorotoje biomasėje mikroskopinių grybų genčių santykis nežymiai pasikeitė – nustatyta dviem gentimis daugiau nei prieš bioterminį apdorojimą, tačiau smarkiai pasikeitė mikroskopinių grybų procentinis santykis. Pagal rugsėjo mėnesio tyrimo rezultatus prieš bioterminį apdorojimą vyravo *Aspergillus fumigatus* gentis (50 %), o *Penicillium* genties mikroskopinių grybų sporų neaptikta. Biotermiškai apdorotame mėšle vyravo *Penicillium* gentis (50 %), o *Aspergillus fumigatus* genties neaptikta. Galima teigti, kad mezofilinis biomasės apdorojimas mikroskopinių grybų nesunaikina, o kai kurių aktyvumas dar padidėja dėl tinkamų daugintis sąlygų.

Daug anaerobinio apdorojimo tyrimų atlikta laboratorinėmis sąlygomis. Laboratorijoje veikiančių reaktorių modeliuose lengviau išlaikyti temperatūros režimą, o gamyboje patogenus sunaikinti ir išvengti rekontaminacijos sunku. (Carrington et al., 1982). Tačiau H. E. Larsen (1995) nurodo tuos pačius tyrimo rezultatus

tiek laboratoriniame, tiek gamybiniame biodujų reaktoriuje.

Tešiant šį darbą reikia ieškoti optimalaus pasterizacijos varianto gamybinėmis sąlygomis mikroorganizmams biomasėje paveikti.

Išvados.

1. Apdorota +50° C temperatūroje biomasė ne visai inaktyvuojama.

2. Termofilinis režimas laboratorinėmis sąlygomis 55–70° C temperatūroje inaktyvavo *S. enteritidis* ir *E. coli* bakterijas.

3. Mikroskopinių grybų prieš bioterminį apdorojimą aptiktos 8 gentys, o biotermiškai apdorojus dėl palankių vystytis sąlygų aptikta 10 genčių.

4. Mezofilinis biomasės apdorojimas nesunaikina mikroskopinių grybų, o kai kurių aktyvumas dar padidėja dėl teigiamų dauginantis sąlygų.

5. Biodujų reaktoriaus poveikis biomasei iš dalies nutraukė infekcinių ligų grandinę, o pagamintos dujos naudotos kaip energijos šaltinis gamybiniais poreikiais.

Literatūra

1. Albin A., Norin E., Lindberg A. Regulation and present situation in Sweden concerning hygienic and environmental safety for anaerobic digestion of waste. In: Bohm R., Wellinger A. (Eds.). Hygienic and Environmental Aspects of Anaerobic Digestion: Legislation and Experience in Europe, Stuttgart-Hohenheim. 1999. P.73–79.

2. Bagge E. National Veterinary Institute. Uppsala, Sweden, personal communication. 2001.

3. Backers H. J., Roberts D., et al. Reference samples for checking the performance of salmonella isolation methods. International Journal of Food Microbiology. 1987. N 4. P. 51–54.

4. Banks J.N. Rapid detection of mould contamination. Annual Science Review 1997–1998. 1999. New York. P. 44–47.

5. Barth C. The rational design standard for anaerobic livestock lagoons. In: Agricultural Waste Utilization and Management. Proceedings of the Fifth Symposium on Agricultural Wastes. Chicago, Illinois. 1985. P. 125–138.

6. Bendixen H. J. Survival and pathways of dissemination of viruses, bacteria and parasites. Proc. 3rd Hohenheimer Seminar 1990. P.167–177. Edited by Deutsche Vet. Med. Gesellschaft, Giessen.

7. Bendixen H. J. Hygienic safety—results of scientific investigations in Denmark Sanitation requirements in Danish BGPs. In: Bohm, R., Wellinger, A. (Eds.), Hygienic and Environmental Aspects of Anaerobic Digestion: Legislation and Experiences in Europe, Stuttgart-Hohenheim.1999. P.27–47.

8. Bendixen H. J., Ammendrup S. Safeguards against pathogens in BGPs. Veterinary research, monitoring and consulting on establishment and operation of joint BGPs. Ministry of Agriculture, Danish Veterinary Service. 1992. P. 35–37.

9. Bitton G. Wastewater Microbiology, second ed. Wiley-Liss. New York. 1999.

10. Carrington E.G., Harman S. H., Pike E. B. Inactivation of *Salmonella* during anaerobic digestion of sewage sludge. J. Appl. Bacteriol. 1982. N. 53. P. 331–334.

11. Collier E. Hygienic and sanitation requirements in BGPs treating animal manures or mixtures of manures and other organic wastes. In: Ortenblad, H. (Ed.), Anaerobic Digestion: Making Energy and Solving Modern Waste Problems, 2000. P. 77–86.

12. Dasgupta A. P., Hull R. R. Late blowing of Swiss cheese: Incidence of *Clostridium tyrobutyricum* in manufacturing milk. Aust. J., Dairy Technol. 1989. N 44. P. 82–87.

13. De Luca G., Zanetti F., Fateh-Moghadm P., Stampi S. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in sewage sludge. Zentr. bl. Hyg. Umweltmed 1998. N 201. P. 269–277.

14. Dom C. R. Review of foodborne outbreak of *Escherichia coli*O157:H7 infection in the western United States. J. Am. Vet. Med.Assoc. 1993. N 203 (11). P. 1583–1587.

15. Dudley D. J., Guentzel M. N., Ibarra M. J., Moore B. E., Sagik B.P.

Enumeration of potentially pathogenic bacteria from sewage sludges. Appl. Environ. Microbiol. 1980. N 39 (1). P.118–126.

16. Dumontet S., Dinel H., Baloda S. B. Pathogen reduction in sewage sludge by composting and other biological treatments: A review. Biol. Agric. Hortic. 1999. N 16. P. 409–430.

17. Espensen B. Praktiske forsøg med smitstoffreducerende behandling af husholdningsaffald. Dansk Vet. Tidsskr. 1996. N. 79 (14). P. 615–622.

18. Farrah S. R., Bitton G., Bacterial survival and association with sludge flocs during aerobic and anaerobic digestion of wastewater sludge under laboratory conditions. Appl. Environ. Microbiol. 1983. N 45 (1). P. 174–181.

19. Hartung M., Gerigk K., *Yersinia* in effluents from the food-processing industry. Rev. Sci. Tech. N 10. 1991. P. 799–811.

20. Henry D. P., Frost A. J., Samuel J. L., O'Boyle D. A., Thomson R. H. Factors affecting the survival of *Salmonella* and *Escherichia coli* in anaerobically fermented pig waste. J. Appl. Bacteriol. 1983. N 55 P. 89–95.

21. Hirsh D. C., Zee Y. C., Veterinary Microbiology. Blackwell Science, Inc. 1999.

22. Holt J. G., Krieg N. R., Sneath P. H. A., Staley J. T., Williams S. T. Bergeys Manual of Determinative Bacteriology, ninth ed. Williams, Wilkins, Baltimore. 1994.

23. Holt J. G., Wojeł R. Krieg et al. Bergeys manual of determinative bacteriology. Ninth edition. Baltimore. 1994.

24. Jacques K. Air Quality and Livestock Waste: Managing Waste Handling Systems. In: T. P. Lyons (ED) Biotechnology in the Feed Industry: Proceedings of Alltech's Fourth Annual Symposium, Alltech Technical Publications, Nicholasville, Kentucky. 1988. P. 315–330.

25. Junttila J. R., Niemela S. I., Him J. Minimum growth temperatures of *Listeria monocytogenes* and non-hemolytic listeria. J. Appl. Bacteriol. 1988. N 65. P. 321–327.

26. Kearney T.E., Larkin, M.J., Frost, J.P., Levett P.N., Survival of pathogenic bacteria during mesophilic anaerobic digestion of animal waste. J. Appl. Bacteriol. 1993b. N 75. P. 215–219.

27. Keller U. Experiences and development of sludge pasteurization in Altenrhein. In: Bruce A.M., Havelaar A.H., L'Hermite P.L. (Eds.), Disinfection of Sewage Sludge: Technical, Economic and Microbiological. Aspects. 1983. P. 53–67.

28. Kudva I. T., Blanch K., Hovde C. J. Analysis of *Escherichia coli* O157:H7 survival in ovine or bovine manure and manure slurry. Appl. Environ. Microbiol. 1998. N 64. P. 3166–3174.

29. Larsen H. E. Bakteriologiske risici ved anvendelse af husdyrgødning og affald. Rev. Dansk Vet. Tidsskrift. 1995. N. 78 (15). P. 763–766.

30. Larsen H. E., Munch B., Schmdt J. Use of indicators for monitoring the reduction of pathogens in animal waste treated in BGPs. Zentrbl. Hyg. Umweltmed. 1994. N 195 P. 544–555.

31. Liukssemburg K., Stanevičius Z. Kombinuotųjų pašarų reikšmė salmoneliozės išplitimui Lietuvoje. Lietuvos veterinarija. 1994. Nr. 1. P. 7–11.

32. Lugauskas A., Krikštaponis A. Toksiškų mikromicetų paplitimas ir alimentarinių toksikozijų galimybės // Tarptautinė konferencija „Gyvulių ir paukščių virškinimo fiziologijos ir patologijos problemos“. 1995. P. 162–168.

33. Lugauskas A. Mikrobiologiniai medžiagų pažeidimai. Vilnius. 1997. P. 390.

34. Melhorn G. Probleme der Lufthygiene unter Bedingungen der industriemässigen Tierproduktion. Internationales Symposium "Emission und Immission von Schadstoffen in der Tierproduktion". Leipzig. 1979. Bd. 1. P. 10–28.

35. Mitscherlich E., Marth E. H. In: Microbial Survival in the Environment. Springer-Verlag, 1984. P. 563–573.

36. Niyo K.A. et al. Mycotoxins economic and health risk. Council for agricultural science and technology. Task force report. No. 116. November. 1989.

37. Notermans S. et. al. Detection of mould in food by the enzyme-linked immunosorbent assay. // J. Food Prot. 1986. N 49 (10). P. 786–791.

38. Opara O. O., Carr L., Russek-Cohen E., Mallison E. T. Correlation of water activity and other environmental conditions with repeated detection salmonella contamination on poultry farms. Avian diseases. 1992 N 3 P. 664–667.

39. Paluszak Z. The influence of anaerobic fermentation on the survival of microorganisms. Electronics Journal of Polish Agricultural Universities. Veterinary Medicina. V. 1. 1996. P. 1–9.

40. Plym Forshel Survival of *Salmonellas* and *Ascaris suum* eggs in a thermophilic BGP. Acta. Vet. Scand. 1995. N 36 (1). P. 79–85.
41. Plym Forshel, Eskesbo I. Survival of *Salmonellas* in urine and dry faeces from cattle. An experimental study. Acta vet. Scand. 1996. N 36. P. 127–131.
42. Stampi S., De Luca G., Varoli O., Zanetti F. Occurrence, removal and seasonal variation of thermophilic *Campylobacters* and *Arcobacter* in sewage sludge. Zentr. bl. Hyg.Umweltmed. 1998/1999. N 202. P.19–27.
43. Smith J.E. et al. Mycotoxin in humans nutrition and health. EC. Directorate-General XII Science research and development EUR 16048 EN. 1994.
44. Scott P.M. Penicillium and Aspergillus Toxins // Mycotoxins in grain compoud another than aflatoxins. Eagan press. St. Paul. Minesota, USA. 1994. P. 26–286.
45. Srainand S., Robinson R. A., Collins J. E. Serological studies of experimentally induced *salmpnella choleraesuis* var. Kunzendorf in pigs. Am. J. Vet. Res. 1995. N 9. P. 1163–1168.
46. Steinbah G., Dinjus U., Gotshaldt J., Kreutzer B. Course of infection and humoral immune reactions in calves infected orally with different salmonella serovars. J. Vet Med. Germany. 1993. N 7. P. 515–521.
47. Strauch D. Animal wastes in pig production as risk for animal and human health. In. The systems of keeping transport and health care of pigs regarding aspects of welfare of animals and the European Union Law Regulations for Protection of Animals. Scient. Conf. 1998. Wroslaw.
48. Strauch D. Survival of pathogenic micro-organisms and parasites in excreta, manure and sewage sludge. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 1991. N 10 (3). P. 813–846.
49. Wang G., Zhao T., Doyle M. P. Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine faeces. Appl. Environ. Microbiol. 1996. N 62 (7). P. 2567–2570.
50. Wellinger A. Process design of agricultural digesters. In: Ortenblad, H. (Ed.), Anaerobic Digestion: Making Energy and Solving Modern Waste Problems. 2000. P. 18–21.
51. Асонов Н. Р. Микробиология. М. 1989. С. 339–342.
52. Курасова В. В., Костин В. В., Шаловская Л. С. Методы исследования ветеринарной микологии. М. 1971.