

REDUCTION OF SANITARY INDICATOR MICROORGANISMS IN ANAEROBIC DIGESTION OF POULTRY LITTER IN COMBINATION WITH SILAGES

РЕДУКЦИЯ НА ПАТОГЕННИ МИКРООРГАНИЗМИ ПРИ МЕЗОФИЛЕН ПРОЦЕС НА АНАЕРОБНО РАЗГРАЖДАНЕ НА ТОРОВА ПОСТЕЛЯ ОТ ПИЛЕТА-БРОЙЛЕРИ В КОМБИНАЦИЯ СЪС СИЛАЖИ

Popova T.¹⁾, Prof. PhD. Marinova S.²⁾, Zaharinov B.³⁾, Kaleva M.¹⁾, Baykov B.³⁾, Kirov V.¹⁾, Assist. Prof. Ph.D. Petrova V.²⁾

¹⁾University of Forestry, Faculty of Veterinary Medicine, Sofia / Bulgaria

²⁾Institute of soil Science "Nikola Pushkarov, Sofia / Bulgaria

³⁾New Bulgarian University, h.c. "Ovcha Kupel", Sofia / Bulgaria

⁴⁾Trakia University, Stara Zagora / Bulgaria

Tel: +359-886-53-15-50, E-mail: dr_tpopova@abv.bg

Abstract: In connection with experiments aimed at optimizing anaerobic digestion of organic fertilizers, microbiological tests were performed to assess the epizootiological safety of resulting finished product to fertilize the soil by quantities of sanitary indicator microorganisms. Mixtures of substrates were composed and tested in technological parameters established for other experiments: mesophilic temperature regime 33°C, dry matter content of 7%, residence time in the digester 15 days. The substrates tested were beetroot, sugar and salad beets, corn silage and leaves of *Paulownia elongata*, and silage combinations of these feeds in ratio 60:40 with mulch litter from broiler chickens. It was found that significant reduction of microorganisms was realized in the final products, which were assessed as safe for soil application.

The ensiling of poultry litter in combinations of these feeds had the effect of reducing the amount of microorganisms in almost all examined groups therein. The most significant was the reduction in the quantity of sanitary revealing bacteria in the manure after its ensilage with autumn leaves of *P. elongata* and beetroot, and the least - with the participation of sugar beet. Microbial reduction was to the greatest extent in bioslime produced by anaerobic digestion of poultry litter ensiled with corn. Of the silages from different types of beets with poultry manure, during anaerobic digestion highest decontamination was achieved in this with sugar beets. After anaerobic degradation of the studied feed without poultry litter, at least microorganisms were found in bioslimes from the three types of beet, as well from the silage from *P. elongata*.

Key words: anaerobic digestion, poultry litter, *Paulownia elongata*, beet, silage, decontamination

INTRODUCTION

At the anaerobic decomposition of organic matter is achieved conversion of organic waste into a source of energy (biogas) as in a source of nutrients for the soil (bioslime), which allows preservation of soil structure and providing biogenic macro- and micronutrients for plants. Despite these advantages, in Bulgaria and some other countries in Europe the construction of biogas plants is still unsatisfactory, as biogas production is biotechnology, the effectiveness of which depends on many factors, some of which are not fully explored [1].

Organic fertilizers can contain pathogenic microorganism such as *Salmonella enterica* and pathogenic *Escherichia coli* serotypes. By fertilizing of agricultural areas these pathogens can be spread into and through the environment into the food chain via plants, food of animal origin, and into drinking water and may cause animal and human infections. Pathogenic *E. coli* such as EHEC,

Резюме: Във връзка с експерименти, насочени към оптимизиране на анаеробното разграждане на органични торове, са извършени микробиологични изследвания за преценка на епизоотологичната безопасност на получените крайни продукти за наторяване на почви според количествата на санитарно индикаторните микроорганизми. Съставени са смеси от субстрати при установени при други експерименти технологични параметри: мезофилен температурен режим 33°C, съдържание на сухо вещество 7%, време на престой в биореактора 15 денонощия. Изпитани са захарно, кърмно и салатно цвекло, царевичен силаж и листа от *Paulownia elongata*, както и силажи от комбинации на тези фуражи в съотношение 60:40 с торова постеля от пилета-бройлери.

Установено е, че се осъществява значително редуциране на микроорганизмите в крайните продукти, които се преценяват като безопасни за внасяне в почвите. В най-голяма степен микробната редукция е при биошлама, получен при анаеробно разграждане на комбинацията от торова постеля с царевичен силаж. От трите вида цвекло, силажирани с птичи тор, при анаеробно разграждане се постига най-висока деконтаминация с участие на захарното цвекло. При анаеробно разграждане на изследваните фуражи без птичи тор най-малко микроорганизми се установяват в биошлаговете от трите вида цвекло, както и в силажа от *P. elongata*.

Ключови думи: анаеробно разграждане, мезофилен режим, птичи тор, *Paulownia elongata*, цвекло, царевича, обеззаразяване

ВЪВЕДЕНИЕ

При анаеробното разграждане се постига превръщане на органичните отпадъци в източник на енергия (биогаз), както и в източник на биогенни елементи за почвата (биошлаг), който позволява запазване на структурата на почвата и осигуряване на биогенни макро- и микроелементи за растенията. Независимо от тези предимства в България и в някои други страни от Европа изграждането на биогазови инсталации е незадоволително, тъй като производството на биогаз е биотехнология, ефективността на която зависи от много фактори, някои от които не напълно проучени [1].

Органичните торове могат да съдържат патогенни микроорганизми като *Salmonella enterica* и патогенни серотипове на *Escherichia coli*. При наторяване на селскостопански площи тези патогени могат да бъдат разпространени в околната среда и чрез нея – в хранителната верига посредством растенията, храните от животински произход и във водата за пиене и могат да причинят инфекции при животни и хора. Патогенни *E. coli* като EHEC, EAEC и EАNEC щамове и *S. enterica* все още са

EAEC and EAHEC strains, *S. enterica* and others are still very important zoonotic pathogens and responsible for high numbers of foodborne diseases all over the world [3]. Therefore, it is necessary an environmental assessment of the efficiency of the anaerobic decomposition of organic substances, one of the important criteria for which is the degree of microbial decontamination, as measured by the number of the sanitary indicator microorganisms. A number of studies in this area are made, including by the use of test microorganisms [6], [8]. The results show sure decontamination in respect of some basic groups of bacteria when the amount of them in the starting material is not very high (up to 10^6 CFU/ml). Studies of other groups suggest that some pathogens remain somewhat in the final.

The aim of this study was to follow the quantitative changes of sanitary indicative microorganisms in poultry manure and plant substrates, subjected to continuous mode mesophilic anaerobic digestion in order to assess the opportunities for their decontamination in this type of processing and receiving epizootological safe final product. The high efficiency of these materials as substrates for biogas production has been demonstrated in previous studies [2], [10].

MATERIALS AND METHODS

The experiments were conducted with a variety of organic substrates. The following feed were tested: sugar beet (S), mangold (M) and red beetroot (R), spring leaves of *Paulownia elongata* (SP), autumn leaves of *P. elongata* (AP) and silage of *P. elongata* (S-P). Also were studied combinations in the ratio of 40:60 of poultry litter (PL) from broiler chickens with: sugar beet (PL+S); mangold (PL+M); beetroot (PL+B); corn (PL+C); autumn leaves of *P. elongata* (PL+AP). The samples were homogenised in a laboratory to a particle size of 2 mm. The materials were tested for the content of dry matter and organic matter by routine methods. Then, the substrates were brought to a solids content of 7%. For the implementation of anaerobic digestion microbial community was formed by depositing microbial biomass from cattle manure (CM) in a final concentration of 10% of the total input into the digester organic substrate.

Anaerobic digestion was carried out using a plastic syringes with a volume of 20-50 ml, of the cone of which were placed a closing tubes, wherein the amount of gas is read directly on the scale on the syringe. These adapted by us laboratory equipments for modeling methane fermentation refer to the type of micro-ecosystem or microcosm according to the classification of [5]. Anaerobic process occurs as per found in our other experiments technological parameters: mesophilic temperature range of $33 \pm 1,0^\circ\text{C}$, dry matter content of 7% and residence time in the thermostat 15 days.

Elective and selective *nutrient media* (Sharlau Chemie S. A., Spain) were used for isolation and quantitative determination of the microorganisms from the studied groups and types. The following media have been chosen: Mueller Hinton agar for counting the total number of microorganisms in the examined material, Eosin Methylene Blue agar for *E. coli* and Gram-negative aerobic bacteria (coliforms), Cetrimide agar for bacteria of the genus *Pseudomonas*, Chapman Stone agar for those of the genus *Staphylococcus*, Sabouraud agar for fungi, selective medium for enterococci, Salmonella-Shigella agar for *Salmonella enterica* and selective agar for *Clostridium perfringens* (Merck-Bio Lab, Bulgaria).

много важни зооантропонозни патогени и са отговорни за голям брой хранителни инфекции по целия свят [3]. Един от важните критерии за екологична преценка на ефективността на анаеробното разграждане на органични вещества е степента на микробна деконтаминация, преценена по броя на санитарно индикаторните микроорганизми. Предвид актуалността на проблема, свързан с възможността да се ограничи разпространението на зоонози, са правени редица изследвания в тази насока, включително и с използване на тест микроорганизми [6], [8]. Резултатите показват сигурна деконтаминация по отношение на някои основни групи бактерии, когато количеството им в изходния материал не е много високо (до 10^6 CFU/ml). Проучванията на други колективи сочат, че някои патогенни микроорганизми се запазват в известна степен в крайния биошлам [4], [7].

Цел на настоящото проучване е проследяване на количествените изменения на санитарно показателни микроорганизми в птичи тор и растителни субстрати, внесени в биореактор с непрекъснат мезофилен режим на анаеробно разграждане, с оглед оценка на възможностите за тяхната деконтаминация при такъв тип на преработка и получаване на епизоотологично безопасен краен продукт. Високата ефективност на тези материали като субстрати за производство на биогас е установена при предишни проучвания [2], [10].

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Опитите са проведени с различни органични субстрати. Изпитани са следните фуражи: захарно (З), крмно (К) и червено цвекло (Ч), пролетни листа от *Paulownia elongata* (ПР), както и есенни листа (ЕР) и силаж от *P. elongata* (СР). Изследвани са също комбинации в съотношение 40:60 от торова постеля от пилета-бройлери със захарно (ПТ+З), крмно (ПТ+К) и салатно цвекло (ПТ+С), царевица (ПТ+Ц) и есенни листа от *Paulownia elongata* (ПТ+Р). Пробите са хомогенизирани в лабораторията до големина на частиците 2 mm. Материалите са изследвани за съдържание на сухо вещество и органично вещество по рутинните методи. След това субстратите са довеждани до съдържание на сухо вещество 7%. За осъществяване на анаеробното разграждане е формирано микробно съобщество чрез внасяне на микробна биомаса от говежди тор (ГТ) в крайна концентрация 10% от общото количество на входящия в биореактора органичен субстрат.

Анаеробното разграждане е осъществено при използване на пластмасови спринцовки с обем 20-50 ml, на конуса на които е поставян затварящ шлах, при което количеството на газа се отчита директно върху скалата на спринцовките. Тези пригодени от нас лабораторни устройства за моделиране на метановата ферментация според класификацията на [5] се отнасят към тип микроекосистема или микрокосмос (МК). Анаеробният процес протича при установени при други наши експерименти технологични параметри: при мезофилен температурен режим от $33 \pm 1,0^\circ\text{C}$, съдържание на сухо вещество 7% и време на престой във ферментатора 15 денонощия.

Хранителни среди. За изолиране и количествено определяне на микроорганизмите от изследваните групи са използвани елективни и селективни среди (Sharlau Chemie S. A., Spain). Подбрани са агар на Mueller Hinton за определяне на общия брой на микроорганизмите, Eosin Methylene Blue агар за *E. coli* и Грам-отрицателните аеробни ббактерии (колиформите), Cetrimide агар за бактериите от род *Pseudomonas*, Chapman Stone агар за тези от род *Staphylococcus*, агар на Сабуро за гъбите, селективна среда за ентерококи, Salmonella-Shigella агар за *Salmonella enterica* и селективен агар за *Clostridium perfringens* от Merck-Bio Lab, България

Quantitative determination of microorganisms was carried out using the classical method in serial (10 times) increasing dilutions of the examined materials in a sterile physiological solution. Cultures on the selected media were prepared from these dilutions, three for each medium and dilution. After incubation at 37°C for 24–72 h under aerobic and anaerobic conditions (with Anaerocult® A mini – Merck-Bio Lab, Bulgaria), the mean arithmetical number of the developed colonies was calculated and the colony forming units (CFU) in 1 g or 1 ml of the initial material were determined.

Statistical analysis of results is made using the classic method of Student-Fisher.

RESULTS

The results of the microbiological examination of the starting materials are presented in table 1.

Количественото определяне на микроорганизмите е извършвано по класическия метод в серийни десетократно нарастващи разреждания на изследваните материали в стерилен физиологичен разтвор. От тях са правени посявки върху подобрите среди с и без антибиотици, по три за всяка среда и разреждане. След инкубиране при 37°C за 24 - 72 h при аеробни и анаеробни условия (с anaerob rack with palladium catalyst – H₂ + CO₂ – Бул Био НЦЗГБ – София) е определян средноаритметичния брой на развилите се колонии и е изчислявано количеството на колонииобразуващите единици (CFU – colony forming units) в 1 g от изходния материал.

Статистическият анализ на резултатите е осъществен посредством класическия метод на Стюдънт-Фишер.

РЕЗУЛТАТИ

Резултатите от microbiological изследвания на изходните материали са представени на таблица 1.

Table 1 / Таблица 1

Content of microorganisms from the studied groups in the starting materials /
Съдържание на микроорганизми от изследваните групи в изходните материали

Material Материал	Microorganisms / Микроорганизми – CFU/g							
	Total number / Общ брой	<i>Staphylococcus</i> <i>sp.</i>	Fungi / Гъби	<i>Pseudomonas</i> <i>sp.</i>	<i>C. perfringens</i>	Coliforms / Колиформи	<i>E. coli</i>	<i>Enterococcus</i> <i>sp.</i>
PL before ensiling	6,9.10 ¹⁰ ±0,7	3,3.10 ⁶ ±0,4	4,7.10 ⁶ ±1,0	1,1.10 ⁶ ±0,2	1,6.10 ⁶ ±0,3	2,5.10 ⁵ ±0,1	1,6.10 ⁵ ±0,7	3,3.10 ⁷ ±0,2
PL+S	7,8.10 ⁹ ±1,2	1,0.10 ⁶ ±0,2	1,0.10 ⁷ ±0,1	9,3.10 ⁵ ±1,2	1,5.10 ⁵ ±0,1	1,4.10 ⁶ ±0,2	5,7.10 ⁴ ±2,3	4,8.10 ³ ±0,8
PL+M	2,7.10 ⁹ ±0,6	2,7.10 ⁴ ±1,2	2,6.10 ⁶ ±0,1	2,9.10 ⁵ ±0,2	3,6.10 ⁵ ±0,1	7,4.10 ⁵ ±1,2	1,7.10 ⁴ ±0,5	1,6.10 ³ ±0,3
PL+B	4,1.10 ⁹ ±0,8	1,1.10 ⁵ ±0,1	2,7.10 ⁵ ±0,9	8,7.10 ⁴ ±2,5	5,6.10 ⁴ ±1,2	1,0.10 ⁴ ±0,0	1,7.10 ³ ±0,9	1,0.10 ² ±0,0
PL+C	9,9.10 ⁹ ±0,8	6,8.10 ⁴ ±1,2	6,8.10 ⁶ ±0,8	8,6.10 ⁵ ±0,9	2,0.10 ⁵ ±0,2	6,3.10 ⁵ ±2,0	7,3.10 ⁴ ±1,7	1,0.10 ² ±0,8
PL+AP	2,1.10 ⁹ ±0,2	2,7.10 ⁴ ±1,2	2,6.10 ⁵ ±1,2	2,7.10 ⁴ ±1,7	4,3.10 ⁴ ±1,2	5,7.10 ⁵ ±1,6	2,3.10 ³ ±0,5	0
CM 10%	3,6.10 ⁹ ±2,2	5,6.10 ⁴ ±1,2	4,3.10 ⁵ ±0,7	4,0.10 ⁴ ±0,8	6,4.10 ⁴ ±0,5	6,6.10 ³ ±4,7	1,3.10 ⁴ ±0,9	1,7.10 ⁴ ±0,4

PL-poultry litter (птичи тор); S-sugar beet (захарно цвекло); M-mangold (кръмно цвекло); B-beetroot (червено цвекло); C-corn (царевица); AP-autumn leaves (есенни листа) of *P. elongata*; CM-cattle manure (говежди тор)

In the test material was not found contain of *Salmonella enterica*.

As can be seen from the data presented, this treatment of the poultry litter had the effect of reducing the amount of microorganisms from almost all examined groups therein. Significantly lower was the total number of microorganisms in all ensiled materials than the poultry litter output ($P < 0.001$) as well as that of staphylococci ($P < 0.01$ in PL+S and $P < 0.001$ in the other ensiled mixtures), of *Pseudomonas sp.* ($P > 0.05$ in PL+S and PL+B, $P < 0.05$ for PL+C and $P < 0.001$ in the other ensiled materials) and of *C. perfringens* ($P < 0.001$). Especially significant reduction in quantities was detected in enterococci and *E. coli* in all tested ensiled material in comparison to the starting poultry manure ($P < 0.001$). To a lesser extent was the decrease in the number of fungi and coliforms therein, even in some of the materials (PL+S, PL+C etc.) was reported some increase in the quantity of fungi, which is reliable only for PL+S ($P < 0.01$) and coliforms, which was statistically significant at PL+S ($P < 0.001$), PL+M ($P < 0.05$) and PL+AP ($P < 0.01$). The most significant was the reduction in the quantity of sanitary revealing microorganisms in poultry manure after its ensilage with autumn leaves of *P. elongata* and beetroot, and the least - with the participation of sugar beet.

On table 2 can be seen the summary results of microbiological studies of ensiled materials after anaerobic digestion.

В изследваните материали не е установено съдържание на *Salmonella enterica*.

Както се вижда от представените данни, тази обработка на птичия тор има за резултат намаляване на количествата на микроорганизмите от почти всички изследвани групи в него. Значително по-малък е общия брой на микроорганизмите при всички силажирани материали в сравнение с изходния тор ($P < 0.001$), както и този на стафилококите ($P < 0.01$ за ПТ+З и $P < 0.001$ за останалите силажирани смеси), на *Pseudomonas sp.* ($P > 0.05$ за ПТ+З и ПТ+С, $P < 0.05$ за ПТ+Ц и $P < 0.001$ за останалите силажирани материали) и на *C. perfringens* ($P < 0.001$). Особено значително намаление в количествата се установява при ентерококите и *E. coli* във всички изследвани силажирани материали в сравнение с изходния тор ($P < 0.001$). В по-малка степен е понижението на броя на гъбите и колиформите в тях, дори при някои от материалите (ПТ+З, ПТ+Ц и др.) се отчита известно увеличение на количествата на гъбите, което е достоверно само при ПТ+З ($P < 0.01$) и на колиформите, което е статистически значимо при ПТ+З ($P < 0.001$), ПТ+К ($P < 0.05$) и ПТ+Р ($P < 0.01$). Най-съществено е понижението на количествата на санитарно показателните микроорганизми в птичия тор след силажирането му с есенни листа от *P. elongata* и салатно цвекло, а най-слабо – с участие на захарно цвекло.

На таблица 2 могат да се видят обобщените резултати от microbiological изследвания на силажираните материали след анаеробното разграждане.

Table 2 / Таблица 2

Content of microorganisms from the studied groups in the ensiled materials after anaerobic digestion / Съдържание на микроорганизми от изследваните групи в силажираните материали след анаеробното разграждане

Material / Материал	Microorganisms (Микроорганизми) – CFU/g							
	Total number / Общ брой	<i>Staphylococcus</i> sp.	Fungi / Гъби	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>C. perfringens</i>	Coliforms / Колиформи	<i>E. coli</i>	<i>Enterococcus</i> sp.
PL+S	4,5.10 ⁷ ±0,4	5,3.10 ⁴ ±1,9	9,3.10 ⁴ ±2,5	1,0.10 ² ±0,8	3,4.10 ⁵ ±0,3	1,4.10 ³ ±0,2	2,0.10 ² ±0,8	4,5.10 ⁴ ±0,3
PL+M	7,7.10 ⁵ ±5,9	7,0.10 ³ ±3,6	5,2.10 ⁴ ±3,4	1,0.10 ³ ±0,4	2,6.10 ⁴ ±0,8	1,0.10 ⁴ ±0,2	4,2.10 ⁴ ±1,3	3,7.10 ⁴ ±0,4
PL+B	2,9.10 ¹⁰ ±0,3	3,3.10 ³ ±1,2	2,7.10 ³ ±1,2	3,7.10 ² ±2,4	2,1.10 ⁴ ±0,6	3,7.10 ² ±1,2	8,0.10 ³ ±0	4,0.10 ⁴ ±0,8
PL+C	1,3.10 ⁶ ±0,5	4,2.10 ⁴ ±0,3	6,0.10 ⁵ ±1,6	1,3.10 ³ ±0,9	4,5.10 ³ ±2,5	4,0.10 ³ ±1,0	2,3.10 ² ±0,9	6,7.10 ⁴ ±1,2
PL+AP	2,7.10 ⁹ ±0,9	3,3.10 ⁴ ±1,7	6,3.10 ⁴ ±1,2	0	6,4.10 ⁴ ±0,3	0,7.10 ² ±0,9	0	5,9.10 ³ ±1,0

PL-poultry litter (птичи тор); S-sugar beet (захарно цвекло); M-mangold (кръмно цвекло); B-beetroot (червено цвекло); C-corn (царевица); AP-autumn leaves (есенни листа) of *P. elongata*

The data shows that in the end bioslimes quantities of microorganisms of the part of the tested groups were lower than those in the starting silages. The total number of microorganisms was considerably less ($P < 0,001$) in bioslimes from PL+S and PL+C, and in the others was reported a slight increase, which was significant only for PL+B ($P < 0,001$). The most considerably was the reduction of the fungi ($P < 0,001$), of *Pseudomonas* sp. ($P < 0,001$) and of the coliforms ($P < 0,001$) in all final materials in comparison with the starting silages. This applies and for the staphylococci except in PL+AP, where was observed slightly implausible increasing in their quantity in the final bioslime ($P > 0,05$). Reduced were the quantities and of *C. perfringens* at the end of the anaerobic degradation of most of the materials tested, but in PL+S и PL+AP was a certain increase was recorded, which was statistically significant only in PL+S ($P < 0,01$). For *E. coli* significant reduction in the quantities ($P < 0,001$) was observed in PL+S, PL+C and PL+AP, and in the other two tested bioslimes slight increase was observed, which was plausible only in PL+B ($P < 0,01$). In all studied bioslimes however was established increase in quantities of enterococci versus baseline silages ($P < 0,001$), but their amounts remained significantly lower than that in the poultry manure ($P < 0,001$) and slightly exceeded that in the used yeast from cattle manure, significant only in PL+C ($P < 0,01$). These results indicate significant decontamination of ensiled in combination with poultry litter feed after the anaerobic digestion, which is in maximal degree in the bioslime from PL+C. Of the three types of beets, ensiled with poultry manure, the highest decontamination by anaerobic digestion was achieved in PL+S.

The results of the microbiological examination of bioslimes, obtained after anaerobic digestion of the starting plant materials (without poultry manure, with the addition only of cattle manure as yeast for anaerobic degradation) are presented in Table 3.

От данните се вижда, че в крайните биосламове количествата на микроорганизмите от част от изследваните групи са по-ниски от тези в изходните силажи. Общият брой на микроорганизмите е значително по-малък ($P < 0,001$) при ПТ+З и ПТ+Ц, а при останалите се отчита слабо повишение, което е достоверно само при ПТ+С ($P < 0,001$). Най-значително е редуцирането на гъбите ($P < 0,001$), на *Pseudomonas* sp. ($P < 0,001$) и на колиформите ($P < 0,001$) във всички крайни материали в сравнение с изходните силажи. Това се отнася и за стафилококите с изключение на ПТ+Р, където се наблюдава слабо недостоверно повишение в количеството им в крайния биослам ($P > 0,05$). Понижени са количествата и на *C. perfringens* в края на анаеробното разграждане на повечето изследвани материали, но при ПТ+З и ПТ+Р се отчита известно повишаване, което е статистически значимо само при ПТ+З ($P < 0,01$). При *E. coli* значително намаление в количествата ($P < 0,001$) се установява при ПТ+З, ПТ+Ц и ПТ+Р, а при останалите два изследвани биослама се наблюдава слабо повишение, което е достоверно само при ПТ+С ($P < 0,01$). Във всички изследвани биосламове обаче се установява повишение в количествата на ентерококите в сравнение с изходните силажи ($P < 0,001$), но количествата им остават значително по-ниски от това в птичия тор ($P < 0,001$) и слабо надвишават това в използваната закваска от говежди тор, значимо само при ПТ+Ц ($P < 0,01$). Тези резултати показват значителна деконтаминация на силажираните в комбинация с птичи тор фуражи след анаеробно разграждане, която е в максимална степен при биослама от ПТ+Ц. От трите вида цвекло, силажирани с птичи тор, при анаеробно разграждане се постига най-висока деконтаминация на ПТ+З.

Резултатите от микробиологичните изследвания на биосламовете, получени след анаеробно разграждане на изходните растителни материали (без птичи тор, с добавка само на говежди тор като закваска при анаеробното разграждане) са представени на табл. 3.

Table 3 / Таблица 3

Content of microorganisms from the studied groups in the plant materials after anaerobic digestion / Съдържание на микроорганизми от изследваните групи в растителните материали след анаеробното разграждане

Material / Материал	Microorganisms (Микроорганизми) – CFU/g							
	Total number / Общ брой	<i>Staphylococcus</i> sp.	Fungi / Гъби	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>C. perfringens</i>	Coliforms / Колиформи	<i>E. coli</i>	<i>Enterococcus</i> sp.
S	3,7.10 ⁷ ±2,3	5,1.10 ³ ±1,9	7,3.10 ⁵ ±0,7	0	0	6,7.10 ² ±5,5	1,5.10 ² ±1,5	5,3.10 ² ±1,2
M	2,0.10 ⁷ ±3,5	1,7.10 ³ ±2,1	1,8.10 ⁶ ±1,2	0	0	0	0	2,7.10 ³ ±2,1
R	1,0.10 ⁷ ±1,7	2,3.10 ³ ±0,6	3,0.10 ⁵ ±1,7	0	6,3.10 ³ ±3,2	5,0.10 ² ±0,7	6,0.10 ² ±0,7	1,7.10 ³ ±0,4
SP	5,0.10 ⁶ ±3,5	5,8.10 ⁴ ±3,8	9,7.10 ⁵ ±5,7	1,0.10 ² ±1,7	5,3.10 ⁴ ±3,2	1,1.10 ³ ±2,0	0,7.10 ² ±1,0	4,3.10 ³ ±0,8
AP	4,5.10 ⁸ ±2,8	2,5.10 ⁵ ±0,4	1,5.10 ⁶ ±1,2	4,7.10 ³ ±5,0	7,3.10 ³ ±2,1	1,5.10 ⁴ ±0,6	6,0.10 ³ ±0,0	6,0.10 ² ±1,0
S-P	1,9.10 ⁸ ±0,9	4,9.10 ³ ±0,6	1,7.10 ⁵ ±1,3	0	1,3.10 ⁴ ±1,2	1,7.10 ³ ±0,4	1,0.10 ² ±1,0	3,4.10 ³ ±1,4
CM 10%	2,0.10 ⁹ ±1,8	9,0.10 ⁴ ±1,0	7,0.10 ⁴ ±1,2	2,2.10 ³ ±1,7	4,0.10 ⁴ ±2,0	5,0.10 ³ ±1,4	1,3.10 ⁴ ±0,9	1,1.10 ⁴ ±1,3

S-sugar beet (захарно цвекло); M-mangold (кръмно цвекло); R-red beetroot (червено цвекло); SP-spring leaves (пролетни листа) of *P. elongata*; AP-autumn leaves (есенни листа) of *P. elongata*; S-P-silage (силаж) of *P. elongata*; CM-cattle manure (говежди тор)

In starting plant substrates were established only staphylococci in amounts up to $5,7 \cdot 10^4 \pm 0,7$ and bacilli, as the total number of microorganisms in them not exceeded $8,3 \cdot 10^6 \pm 0,2$. Presence of sanitary indicative microorganisms was not established, which in the materials of *P. elongata* was proved also in our previous studies [9]. As seen from the table, the microorganisms from all traced groups were in smallest quantities in the bioslimes of these materials in comparison with the added as starter cow manure, as well as compared to bioslimes of the substrates ensiled with poultry litter. The total number of microorganism was a significantly lower ($P < 0,001$) for bioslimes obtained after digestion of all tested feed, as well as that of the *E. coli* and the enterococci ($P < 0,01$). The staphylococci were also significantly less in the bioslimes from the three types of beet ($P < 0,001$) and from spring leaves of *P. elongata* ($P > 0,05$), but in the bioslime from autumn leaves was reported an increase of these bacteria ($P < 0,001$). Particularly considerably was the reduction of bacteria of the genus *Pseudomonas* in all tested bioslimes ($P < 0,001$) except in that of autumn leaves of *P. elongata*, in which establishes a slight increase of these bacteria ($P > 0,05$). This applies also for the number of coliforms in these substrates. *C. perfringens* was also significantly reduced in bioslimes, except that of the autumn leaves of *P. elongata*, which was increased in comparison with this in the added cow manure ($P < 0,01$). Quantities of fungi, however, were higher in all bioslimes compared to the yeast of cattle manure ($P < 0,01$ for the autumn leaves of *P. elongata*, and $P < 0,001$ for the rest bioslimes).

The smallest was number of microorganisms in the bioslimes from the three types of beet, as well as in this of silage from *P. elongata*. Very low were values of the sanitary indicative microorganisms (of *E. coli*, enterococci and *C. perfringens*), as well as of coliforms and *Pseudomonas* sp. The results show that bioslimes from the tested plants substrates were safe from epizootological standpoint for application to the soil as fertilizer.

DISCUSSION

First [2] presented new renewable energy source - a mixture of manure and energy crops. These authors proposed for the first time the possibility of integrating two types of biotechnologies - lactic acid fermentation and anaerobic decomposition of the substrate, which includes silage from *Paulownia elongata*. Our studies show that in this technology was achieved a high degree of decontamination of the manure ensiled with autumn leaves of *P. elongata* with a substantial reduction in the quantity of sanitary indicative microorganisms. Moreover, beet is one of best sources of biogas because of its high content of dry matter, organic matter and sucrose. According to [10] sugar beet is with the highest content of dry matter among the three beet species, which is an advantage in this respect, while fodder beet has the lowest values. Also sugar beet is distinguished by high percentage of organic matter. Probably because of this high content of sugar and organic matter in sugar beet decontamination of poultry litter after the ensilage in combination with this type of beet was relatively less compared with the other combinations tested by us. The most significant was the reduction in the quantity of sanitary indicative microorganisms in poultry manure after its ensilage with autumn leaves of *P. elongata* and beetroot, and the least - with the participation of sugar beet. After the anaerobic digestion of these feed

В изходните растителни субстрати се установяват единствено стафилококи в количества до $5,7 \cdot 10^4 \pm 0,7$ и бацили, като общият брой на микроорганизмите в тях не надвишава $8,3 \cdot 10^6 \pm 0,2$. Не се установява наличие на санитарно показателни микроорганизми, което за материалите от *P. elongata* е установено и при предишни наши изследвания [9]. Както се вижда от таблицата, микроорганизмите от всички изследвани групи са в най-малки количества в биошламовете от тези материали, в сравнение с прибавения като закваска говежди тор, както и в сравнение с биошламовете от силажираните с птичия тор субстрати. Общият брой на микроорганизмите е значително по-малък ($P < 0,001$) при биошламовете, получени след анаеробното разграждане на всички изследвани фуражи, както и този на *E. coli* и на ентерококите ($P < 0,01$). Стафилококите също са значително по-малко в биошламовете от трите вида цвекло ($P < 0,001$) и в пролетните листа от *P. elongata* ($P > 0,05$), но при биошлама от есенни листа на *P. elongata* се отчита повишение на тези бактерии ($P < 0,001$). Особено значително е редуцирането на бактериите от род *Pseudomonas* във всички изследвани биошламовете ($P < 0,001$) освен в този от есенни листа от *P. elongata*, в който се установява слабо повишение на тези бактерии ($P > 0,05$). Това се отнася и за броя на колиформите в тези субстрати. *C. perfringens* също е значително редуциран в биошламовете с изключение на този от есенните листа от *P. elongata*, в който е повишен спрямо този в прибавения говежди тор ($P < 0,01$). Количествата на гъбите обаче са по-високи във всички биошламовете спрямо закваската от говежди тор ($P < 0,01$ за есенните листа от *P. elongata* и $P < 0,001$ за останалите биошламовете).

Най-малко са микроорганизмите в биошламовете от трите вида цвекло, както и в силажа от *P. elongata*. Много ниски са стойностите на санитарно показателните микроорганизми (на *E. coli*, ентерококите и *C. perfringens*), както и наколиформите и на *Pseudomonas* sp. Резултатите показват, че биошламовете, получени от изследваните растителни субстрати, са безопасни от епизоотологична гледна точка за приложение в почвата като естествени торове.

ОБСЪЖДАНЕ

За пръв път [2] първи представиха нов възобновяем енергиен източник – смес от тор и енергийни култури. Тези автори предлагат за пръв път възможността за интегриране на биотехнологии от два типа – млечно кисела ферментация и анаеробно разграждане на субстратите, като включват и силаж от *Paulownia elongata*. Нашите изследвания показват, че при тази технология се постига висока степен на деконтаминация на птичия тор, силажиран заедно с есенни листа от *P. elongata* със съществено понижение на количествата на санитарно показателните микроорганизми. Освен това цвеклото е един от най-добрите източници на биогас поради високото си съдържание на сухо и органично вещество, както и на захароза. Според [10] захарното цвекло е с най-високо съдържание на сухо вещество от трите вида цвекло, използвани от нас, което е предимство в това отношение, докато салатното цвекло е с най-ниско съдържание. Също така захарното цвекло се отличава с високо съдържание на органична материя. Вероятно поради това високо съдържание на захар и органична материя в захарното цвекло, деконтаминацията на птичи тор след силажирането му в комбинация с този вид цвекло е в сравнително по-малка степен спрямо другите изследвани от нас комбинации. Най-съществено е понижението на количествата на санитарно показателните микроорганизми в птичия тор след силажирането му с есенни листа от *P. elongata* и салатно цвекло, а най-слабо – с участие на захарно цвекло. След анаеробно разграждане на тези

ensiled in combination with poultry litter there was a further substantial decontamination, which was in the maximum degree in the bioslime from silage of poultry manure and corn. Of the three types of beets, ensiled with poultry manure, in anaerobic digestion was achieved the highest decontamination of the silage from poultry litter and sugar beet. The period of full fermentation of sugar beet is relatively short: in the range of 15 to 20 days (compared with silage corn about 90 days). In addition, methane yields per hectare are at about 20% more than that of silage corn (54 t/ha corn correspond to 80 t/ha sugar beet). Furthermore, sugar beet has the lowest values of nitrogen and this is one of its main advantages in producing of biogas [10]. Our studies indicate that decontamination of cattle manure in the presence of fodder beet, which has the lowest values of organic matter, was at a highest level compared to the other tested species beets and fodder.

The proposed from [2] combination of both technologies called cotechnology allows to increase the efficiency of biogas production, as main reason for this is the precise combination of materials, that integrate two main ideas: utilization of the greatest possible amount of organic waste from livestock and increasing energy and economic efficiency through the introduction of plant biomass - silage. Individual raw materials (animal manure, corn silage, etc.) are mixed into common mass. In the application of this principle of cofermentation the organic manure (poultry, cattle or pig) mixed with plant biomass is an effective material and substrate for biogas production, as the potential for release of methane in the process of decay is very large. Ensilage is biotechnology, in which microorganisms break down a part of carbohydrates. As a result of the action of hetero fermentative anaerobic bacteria are synthesized lactic acid, acetic acid and alcohol. This leads to stimulation of further biochemical processes for the formation of biogas. Thus the generation of biogas is supported and better efficiency of biogas installation is achieved. At the biogas production, however, of particular importance is the experimental verification of the epizootiological safety of the end bioslimes after anaerobic digestion of substrates. The results of these experiments in this direction show that the resulting end products of all tested materials are environmentally safe and their application to improve soil fertility not hiding risks of spread of pathogenic microorganisms.

CONCLUSIONS

- The ensilage of poultry litter mixed with corn, autumn leaves of *Paulownia elongata* and with different types of beet had the effect of reducing the amount of microorganisms from almost all studied groups in it, which was particularly significantly in enterococci and *E. coli*. The most substantially was the reduction in the quantity of the sanitary indicative microorganisms in poultry manure after its ensilage with autumn leaves of *P. elongata* and beetroot, and the least - with the participation of sugar beet.
- In continuous mesophilic mode of anaerobic digestion of feed ensiled in combination with poultry manure for 15 days significant microbial decontamination was achieved, including regarding the sanitary indicative bacteria such as *E. coli* and enterococci. It was maximal in the bioslime from poultry manure and corn. Of the three types of beets, ensiled with poultry manure, the highest decontamination

силажирани в комбинация с птичи тор фуражи се наблюдава допълнително значителна деконтаминация, която е в максимална степен при биошлама от силажа от птичи тор и царевица. От трите вида цвекло, силажирани с птичи тор, при анаеробно разграждане се постига най-висока деконтаминация на силажа от птичи тор и захарно цвекло. Периодът на пълна ферментация на захарното цвекло е относително кратък: в интервал от 15 до 20 дни (в сравнение с царевичния силаж, който е около 90 дни). Освен това добивът на метан от хектар е с около 20% по-висок от този от царевичния силаж (54 t/ha за царевицата в сравнение с 80 t/ha за захарното цвекло). Нещо повече, захарното цвекло има най-ниско съдържание на азот и това е едно от неговите най-големи предимства при производството на биогаз [10]. Настоящите изследвания показват, че деконтаминацията на говеждия тор в присъствие на салатно цвекло е в най-висока степен в сравнение с останалите изследвани видове цвекло и фуражи. Според [10] този вид цвекло има най-ниско съдържание на органично вещество.

Презложеното от [2] съчетаване на двете технологии, наречено котехнология, позволява да се повиши ефективността на производството на биогаз, като основната причина за това е прецизното комбиниране на суровините, които интегрират две основни идеи: оползотворяване на възможно най-голямо количество органични отпадъци от селскостопанските животни и повишаване на енергийната и икономическа ефективност чрез внасяне на растителна биомаса – силаж. Отделните суровини (животинска тор, царевичен силаж и др.) се смесват в една обща маса. При приложението на този принцип на коферментацията органичният тор (птичи, говежди или свински), смесен с растителната биомаса, е ефикасна суровина и субстрат за производството на биогаз, тъй като потенциалът за отделяне на метан в процеса на гниене е много голям. Силажирането е биотехнология, при която микроорганизми разграждат част от въглеhidратите. В резултат от действието на хетеро-ферментативни анаеробни бактерии, се синтезира млечна киселина, оцетна киселина и алкохол. Това води до стимулиране на по-нататъшните биохимични процеси до образуване на биогаз. По този начин се подпомага образуването на биогаз и се постига по-добра ефективност на биогаз инсталацията. При производството на биогаз обаче от особено голямо значение е експерименталната проверка на епизоотологичната безопасност на крайните биошлагове след анаеробното разграждане на субстратите. Резултатите от настоящите експерименти в тази насока показват, че получените крайни продукти от всички изследвани материали са екологично безопасни и прилагането им за повишаване на почвеното плодородие не крие рискове от разпространение на патогенни микроорганизми.

ИЗВОДИ

- Силажирането на птичия тор, смесен с царевица, есенни листа от *Paulownia elongata* и с различни видове цвекло има за резултат намаляване на количествата на микроорганизмите от почти всички изследвани групи в него, което е особено значително при ентерококите и *E. coli*. Най-съществено е понижението на количествата на санитарно показателните микроорганизми в птичия тор след силажирането му с есенни листа от *P. elongata* и салатно цвекло, а най-слабо – с участие на захарно цвекло.
- При непрекъснат мезофилен режим на анаеробно разграждане на силажираните в комбинация с птичи тор фуражи в продължение на 15 дни се постига значителна микробна деконтаминация, включително по отношение на санитарно показателните бактерии като *E. coli* и ентерококите. Тя е в максимална степен при биошлама от птичи тор и царевица. От трите вида цвекло, силажирани

by anaerobic digestion was achieved by involvement of sugar beet.

- In the investigated plant substrates, subjected to digestion with bovine manure, at least were microorganisms in the bioslimes of the three types of beet and of silage from *P. elongata*. The received bioslimes were safe from epizootological standpoint for application to the soil as fertilizer.

ACKNOWLEDGMENT

This work is funded by NSF as a result of project implementation FFNIPO-12-01283 "Ecologization of agro-environmental systems and increase their energy efficiency by applying a recast bio organic waste for fertilization, introduction of energy crops and complex use of biomass as an energy source" (Contract DFNI-E01 / 3 of 27/11/2012).

REFERENCES

- [1]. Al Seadi T. (2001) - *Good practice in quality management of AD residues from biogas production*, Report made for the International Energy Agency, Task 24- Energy from Biological Conversion of Organic Waste. Published by IEA Bioenergy and AEA Technology Environment, Oxfordshire, United Kingdom;
- [2]. Baykov B. D., Shindarska Z., Kirov V., Kostadinova G. (2013) - *Increasing the effectiveness of a holding company for organic cow milk production by using new biogas substrate*, Proceeding of XVIth ISAH Congress 2013 "Animal Hygiene, Health and Welfare as Corner Stones of Sustainable Animal Production", International Society for Animal Hygiene, Nanjing, China, pg. 385-387;
- [3]. Eling R., Philipp W., Hoelzle, L. E. (2013) - *Survival of enteroaggregative hemorrhagic E. coli (EAHEC) O104: H4 and monophasic variant (O4, [5], 12: I: -) of Salmonella Typhimurium in organic fertilizer such as sewage sludge, slurry and biogas plant effluents during storage and heat inactivation*, Proceeding of XVIth ISAH Congress 2013 "Animal Hygiene, Health and Welfare as Corner Stones of Sustainable Animal Production", International Society for Animal Hygiene, Nanjing, China, pg. 400-402;
- [4]. Gannoun H., Bouallagui H., Okbi A., Sayadi S., Hamdi M. (2009) - *Mesophilic and Thermophilic Anaerobic Digestion of Biologically Pretreated Abattoir Waste Water in an Upflow Anaerobic Filter*. Journal of Hazardous Materials, vol. 170, no 1, pg. 263-271;
- [5]. Odum Y. (1986) - *Ecology*, M., Mir, pg. 79-88,
- [6]. Petkov Y., Simeonov I., Baykov B., Popova T. P. (2008) - *Comparative analyses of continuous and sequensic batch regime of anaerobic digestion of poultry litter*, Scientific Conference of FVM - FTU "Traditions and contemporaneusness in Veterinary Medicine", Proceedings, FTU, 78 - 87;
- [7]. Philipp W., Ade-Kappelmann K., Drca M., Lorenz H., Böhm R. (2005) - *New hygiene rules for biogas plants – revising German biowaste ordinance*. ISAH, Warsaw, Poland, vol. 2, pg. 234 – 227.
- [8]. Popova T., Popova I., Baykov B., Petkov Y., Zaharinov B., Marinova N. (2007) - *Comparative hygiene assessment of technologies for organic manure utilization with high content of dry matter 1. Reduction of pathogenic microorganisms in a continuous mesophilic process of anaerobic degradation*. XIII International Congress in Animal Hygiene ISAH - 2007, June 17 – 21, Animal Health, Animal Welfare and Biosecurity, Tartu, Estonia, Proceedings, vol. 1, pg. 549-552.

с птичи тор, при анаеробно разграждане се постига най-висока деконтаминация при участието на захарно цвекло.

- При изследваните растителни субстрати, подложени на разграждане с говежди тор, най-малко са микроорганизмите в биошлаговете от трите вида цвекло, както и в силажа от *P. elongata*. Получените биошлагове са безопасни от епизоотологична гледна точка за приложение в почвата като естествени торове.

БЛАГОДАРНОСТИ

Настоящата разработка е финансирана от ФНИ в резултат на изпълнение на научно-изследователски проект FFNIPO-12-01283 "Екологизация на агроекологични системи и повишаване на енергийната им ефективност чрез прилагане на преработени биоорганични отпадъци за торене, интродуциране на енергийни култури и комплексно използване на биомасата като енергоносител" (Договор DFNI-E01 / 3 от 27/11/2012).

REFERENCES

- [1]. Ал. Шеади Т. (2001) - *Сборник с добри практики в управлението на качеството на АД остатъци от производство на биогаз*, Изготвен отчет за Международната агенция по енергетика, Задача 24 - Енергия на биологичното преобразуване от органични отпадъци. Публикуван от Биоенергия IEA и AEA Technology околна среда, Оксфордшир, Великобритания;
- [2]. Байков Б., Шиндарска З., Куров В., Костадинова Г. (2013) - *Повишаване ефективността на холдингово дружество за биологично производство на краве мляко чрез използване на нов субстрат от биогаз*. Изхождайки от XVI-ия Конгрес ISAH 2013 "Хигиена на животните, здравеопазването и социалните грижи, както крафгален камък на устойчиво Животновъдство", Международна общност за животновъдна хигиена, Nanjing, Китай, PG. 385-387;
- [3]. Елинг Р., Филип Л., Хоелзи Л. (2013) - *Оценка на ентероагрегати на E. coli (хеморагични EAHEC) O104: H4 и монофазен вариант (O4, [5], 12: I: -) на Salmonella Typhimurium в органична тор като например утайки от отпадъчни води, течен тор и биогазови растителни отпадъци време на съхранение и топлин дезинфекциране*. Изхождайки от XVI-ия Конгрес ISAH 2013 "Хигиена на животните, здравеопазването и социалните грижи, както Corner Stones на устойчиво Животновъдство", Международна общност за животновъдна хигиена, Nanjing, Китай, PG. 400-402;
- [4]. Гонау Х., Буалози Х., Окаби А., Саиди С., Хамди М. (2009) - *Мезофилни и термофилни анаеробно разлагане на биологични третирана вода от кланица отпадъка по възходящ поток Анаеробни Filter*. Вестник на опасните материали, кн. 170, № 1, стр. 263-271;
- [5]. Одум Й. (1986) - *Екология*, М., Мир, pg. 79-88,
- [6]. Петков Й., Симеонов И., Б. Байков, Попова Т. (2008) - *Сравнителни анализи на непрекъсната и последователна партида режим на анаеробно разлагане на птичи отпадъци*. Научна конференция на FVM - FTU "Традиции и съвременност във ветеринарната медицина", Сборник, FTU, 78-87;
- [7]. Филип Л., Аде-Капелман К., Дерка М., Лоренз Н., Бьом Р. (2005) - *Нови хигиенни правила за инсталации за биогаз - преразглеждане на наредбата за немски биоотпадъци*, ISAH, Варшава, Полша, кн. 2, стр. 234-227;
- [8]. Попова Т., И. Попова, Б. Байков, Петков Й., Захаринов Б., Маринова, Н. (2007) - *Сравнителен хигиена характеристика на технологии за използване на органични торове с високо съдържание на сухо вещество 1*, Намаляване на патогенни микроорганизми в непрекъснат мезофилен процес на анаеробно разграждане. XIII Международен конгрес по животните Хигиена ISAH - 2007, June 17-21, здравеопазване на животните, хуманно отношение към животните и биосигурността, Tartu, Естония, производство, об. 1, стр. 549-552;

[9]. Popova T. P., Baykov B. D., Shindarska Z. (2013) - *Study on decontamination of silage from Paulownia elongata*, Proceeding of XVIth ISAH Congress 2013 "Animal Hygiene, Health and Welfare as Corner Stones of Sustainable Animal Production", International Society for Animal Hygiene, Nanjing, China, pg. 278-280;

[10]. Shindarska Z., Kirov V., Popova T., Baykov B. (2013) - *New materials for biogas production in livestock farms in Bulgaria*, Proceeding of XVIth ISAH Congress 2013 "Animal Hygiene, Health and Welfare as Corner Stones of Sustainable Animal Production", International Society for Animal Hygiene, Nanjing, China, pg. 388-390.

[9]. Попова Т., Байков Б., Шиндарска З. (2013) - *Проучване на обеззаразяване на силаж от Paulownia elongata*, Извадка от XVI-ия Конгрес ISAH 2013 "Хигиена на животните, здравеопазването и социалните грижи, както краъгълен камък на устойчиво Животновъдство", Международното общество за животните Хигиена, Nanjing, Китай, PG. 278-280;

[10]. Шиндарска З., Киров В., Т. Попова, Б. Байков (2013) - *Нови материали за производство на биогаз в животновъдните стопанства в България*, Извадка от XVI-ия Конгрес ISAH 2013 "Хигиена на животните, здравеопазването и социалните грижи, както Corner Stones на устойчиво Животновъдство", Международното общество за животните Хигиена, Nanjing, Китай, PG. 388-390.