

ВЛИЯНИЕ СУРФАКТАНТОВ НА МИКРОБИОЦЕНОЗ БИОПЛЕНОК НАВОЗНЫХ СТОКОВ

Пилип Л. В., кандидат ветеринарных наук, доцент

E-mail: pilip_larisa@mail.ru

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

«Вятский государственный агротехнологический университет»,
г. Киров, Россия

Аннотация. Для существования и размножения, в том числе при неблагоприятном действии факторов окружающей среды, микроорганизмы, грибы, вирусы могут создавать консорциумы. Такие сообщества формируются на поверхности навозных стоков животных в виде биопленок, замедляя интенсивность газообразования. В современном промышленном животноводстве широко используют поверхностно-активные вещества, которые в составе моющих средств и фармакологических ветеринарных препаратов попадают в навозные стоки, изменяя микробиоценоз биопленок. Доминирующее положение в биопленках отсепарированных свиных навозных стоков составляли грамположительные анаэробные микроорганизмы, преимущественно *Staphylococcus* ssp., *Lactobacillus* ssp., *Clostridium* ssp. Чувствительными к действию всех типов ПАВ (катионных, анионных и неионогенных) оказались грамположительные *Staphylococcus epidermidis*, *Lactobacillus* ssp. и *Bifidobacterium* ssp., толерантными – *Clostridium* ssp. Анионные ПАВ губительно действуют на грамотрицательные *Bacteroides* sp. и *Pseudomonas* spp., устойчивы к ним *Fusobacterium* sp. Более эффективным в отношении грамотрицательных микроорганизмов оказался анионный ПАВ, менее результативным – катионный ПАВ, особенно в отношении *Klebsiella* sp. и *Prevotella* sp. Практически не изменилась под действием ПАВ численность грибов *Candida* sp. и *Aspergillus* ssp.

Ключевые слова: навозные стоки, микроорганизмы навозных стоков, запаховое загрязнение, поверхностно-активные вещества, *Clostridium*, экологическая проблема

SURFACTANTS INFLUENCE ON THE MICROBIOCENOSIS OF MANURE EFFLUENTS BIOFILM

Pilip L. V., candidate of veterinary sciences, associate professor

E-mail: pilip_larisa@mail.ru

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education
“Vyatka State Agrotechnological University”, Kirov, Russia



Annotation. For existence and reproduction, also under the adverse effects of environmental factors, microorganisms, fungi and viruses can create consortia. Such communities are formed on the surface of animal manure in the form of biofilms, slowing down the intensity of gas formation. In modern industrial animal husbandry, surfactants are widely used, which, as a part of detergents and pharmacological veterinary drugs, enter manure drains, changing the microbiocenosis of biofilms. Gram-positive anaerobic microorganisms, mainly *Staphylococcus* ssp., *Lactobacillus* ssp., *Clostridium* ssp., have dominated in the biofilms of separated pig manure effluents. Gram-positive *Staphylococcus epidermidis*, *Lactobacillus* ssp. and *Bifidobacterium* ssp. have been found out to be sensitive to the action of all types of surfactants (cationic, anionic and nonionic), tolerant of *Clostridium* ssp. Anionic surfactants have the detrimental effect on gram-negative *Bacteroides* sp. and *Pseudomonas* sp., *Fusobacterium* sp. are resistant to them The anionic surfactant has turned out to be more effective against gram-negative microorganisms, cationic surfactant has been less effective, especially against *Klebsiella* sp. and *Prevotella* sp. The number of fungi *Candida* sp and *Aspergillus* ssp. has not significantly changed under the surfactants action.

Keywords: manure effluents, microorganisms of manure effluents, odor pollution, surfactants, *Clostridium*, environmental problem

Введение. Проблема обеспечения продовольственной безопасности связана с проблемой экологической безопасности, возникающей при функционировании животноводческих предприятий [3, 9]. Промышленное животноводство оказывает существенное негативное влияние на окружающую среду, причем преимущественно от систем утилизации навоза/помета [4, 8]. Решение проблемы запахового загрязнения окружающей среды, источником которого являются навозные стоки животноводческих предприятий, образующиеся в больших объемах, становится приоритетной задачей сельскохозяйственной отрасли [2, 5, 7]. Биопленки формируются на различных поверхностях [13, 14], в том числе на поверхности навозных стоков [15, 18]. Изучение микробиоценоза биопленок является новым, перспективным направлением микробной экологии, позволяющим обеспечивать биобезопасность отрасли [15, 17]. Изучение микробиоценоза навозных стоков позволит разработать новые подходы к снижению запаховой нагрузки от животноводческих комплексов, а также предотвратить биологическое



загрязнение окружающей среды отходами животноводческой отрасли (побочные продукты животноводства) [6, 10]. Поверхностно-активные вещества (ПАВ, или сурфактанты) широко применяются в животноводстве благодаря их солюбилизирующему эффекту, высокой поверхностной активности, способности образовывать лиофильные коллоидные растворы и снижать поверхностное натяжение [1, 11]. Кроме того, катионные ПАВ проявляют бактерицидные и дезинфицирующие свойства [12].

Цель настоящей работы состояла в оценке влияния сурфактантов на микробиоценоз биопленок навозных стоков.

Материалы и методы исследований. Объектом исследования явились образцы биопленок, образовавшиеся на поверхности жидкой фракции свиных навозных стоков. Получению биопленок предшествовало внесение в емкости с жидкой фракцией свежих навозных стоков различных типов сурфактантов: катионных поверхностно-активных веществ (*Benzalkonium chlorides*), неионогенных ПАВ (*Lauryl dimethylamine oxide*) и анионных ПАВ (*Sodium laureth sulfate*) в дозировке 0,04 г на 4 л жидкой фракции. После тщательного перемешивания образцы оставляли на 14 суток в темном месте, затем отбирали в стерильные емкости и транспортировали в микробиологическую лабораторию. Микробиологические исследования включали ряд серийных десятикратных разведений с последующим высевом материала (модифицированный агаровый чашечный метод ОФС.1.7.2.0008.15) на стандартные и специализированные питательные среды и определением концентрации микробных клеток (КОЕ/г). Идентификацию микроорганизмов проводили с использованием биохимических тестов АНАЭРОтест 23, ЭНТЕРОтест 24N, СТАФИтест16, СТРЕПТОтест16, САНДИДАтест21. Для выделения анаэробных бактерий использовали питательные среды АнаэроАгар, микроанаэроостат, газогенерируемые пакеты для создания анаэробнобиоза. Культивирование дрожжей осуществляли на среде Сабуро. Исследования



выполняли в трехкратной повторности. Статистическую обработку результатов проводили стандартными методами

Результаты исследования. В ходе исследований обнаружено, что доминирующее положение в биопленках отсепарированных свиных навозных стоков составляют грамположительные анаэробные микроорганизмы (81,49%), представленные *Staphylococcus epidermidis*; *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. cellobiosum*, *L. Crispatus*; *Bifidobacterium* ssp.; *Clostridium putrificum*, *Cl. perfringens*, *Cl. sporogenes*, *Cl. bifermentans*, *Cl. septicum*, *Cl. difficile*.

Использование *Benzalkonium chlorides* позволило снизить количество микроорганизмов с $9,6 \cdot 10^5$ (81,49% от общей численности микроорганизмов) до $7,0 \cdot 10^5$ КОЕ/мл (46,13%), а применение *Sodium laureth sulfate* до $7,8 \cdot 10^5$ КОЕ/мл (49,15%). Менее эффективным оказался *Lauryl dimethylamine oxide*, его добавка повлияла на уменьшение грамположительных микроорганизмов до $8,8 \cdot 10^5$ КОЕ/мл (55,38%). В таблице 1 представлено влияние сурфактантов на грамположительные микроорганизмы биопленок навозных стоков.

Таблица 1 – Влияние сурфактантов на микробиоценоз грамположительных микроорганизмов свиных навозных стоков

№ п/п	Микроорганизмы	Типы сурфактантов		
		катионные	неионногенные	анионные
1	<i>Clostridium</i> ssp.	оказались устойчивы		
2	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	полностью исчезли		
3	<i>Lactobacillus</i> ssp.	полностью исчезли		
4	<i>Bifidobacterium</i> ssp.	полностью исчезли		

Грамположительные микроорганизмы свиных навозных стоков оказались чувствительными к действию различных сурфактантов. Такие микроорганизмы, как *Staphylococcus epidermidis*, *Lactobacillus* ssp. и *Bifidobacterium* ssp., полностью исчезли из микробиоценоза навозных стоков, наиболее же устойчивыми оказались микроорганизмы рода *Clostridium*.



Грамотрицательные микроорганизмы биопленок навозных стоков были малочисленны. В нативных навозных стоках их численность достигала лишь $13,26 \cdot 10^3$ КОЕ/мл (1,12% от общего числа микроорганизмов). Более эффективны в отношении грамотрицательных анаэробов, представленных *Escherichia coli*, *E. blattae*, *E. coli inactive*, *E. fergusonii*, *E. hermannii*, *E. vulneris*; *Proteus vulgaris*; *Klebsiella* sp.; *Prevotella* sp.; *Fusobacterium* sp.; *Bacteroides* sp. и аэроба *Pseudomonas* spp. оказались неионогенные и анионные ПАВ. Так, неионогенный ПАВ снизил общее количество грамотрицательных микроорганизмов с $13,26 \cdot 10^3$ до $2,01 \cdot 10^3$ КОЕ/мл (с 1,12% до 0,13%), а анионный ПАВ – до $2,1 \cdot 10^3$ КОЕ/мл (0,14%). Применение катионного ПАВ уменьшило общее количество грамотрицательных микроорганизмов с $13,26 \cdot 10^3$ до $10,05 \cdot 10^3$ КОЕ/мл (с 1,12 до 0,69%). В таблице 2 представлено влияние сурфактантов на грамотрицательные микроорганизмы биопленок навозных стоков.

Таблица 2 – Влияние сурфактантов на микробиоценоз грамотрицательных микроорганизмов свиных навозных стоков

№ п/п	Микроорганизмы	Типы сурфактантов		
		катионные	катионные	анионные
1	<i>Escherichia coli</i>	количественно уменьшились		
2	<i>Proteus vulgaris</i>	количественно уменьшились		
3	<i>Klebsiella</i> sp.	практически не изменили количество	количественно уменьшились	
4	<i>Prevotella</i> sp.	практически не изменили количество	количественно уменьшились	
5	<i>Fusobacterium</i> sp.	практически не изменили количество		
6	<i>Bacteroides</i> sp.	количественно уменьшились		полностью исчезли
7	<i>Pseudomonas</i> spp.	количественно уменьшились		полностью исчезли

Различные ПАВ различным образом влияют на грамотрицательные микроорганизмы свиных навозных стоков. Так, под влиянием анионных ПАВ



из навозных стоков полностью исчезли лишь *Bacteroides* sp. и *Pseudomonas* spp., а количество *Fusobacterium* sp. не изменилось. Тем не менее более эффективным в отношении грамотрицательных микроорганизмов свиных навозных стоков оказался именно анионный ПАВ. Менее результативным оказался катионный ПАВ, особенно в отношении *Klebsiella* sp. и *Prevotella* sp.

Грибы, являясь постоянным участником консорциумов биопленки навозных стоков, занимают второе место по численности после грамположительных микроорганизмов. Грибное разнообразие в данном эксперименте представлено *Candida* sp. и *Aspergillus* spp.

В таблице 3 показано влияние сурфактантов на грибы биопленок навозных стоков.

Таблица 3 – Влияние сурфактантов на микробиоценоз грибов свиных навозных стоков

№ п/п	Микроорганизмы	Типы сурфактантов		
		катионные	неионогенные	анионные
1	<i>Candida</i> sp.	увеличились незначительно		практически не изменили количество
2	<i>Aspergillus</i> spp.	увеличились незначительно		

Следует отметить, что общее количество грибов в консорциуме биопленок выросло, однако количество *Candida* sp. и *Aspergillus* spp. практически не изменилось. Увеличение удельного веса грибов произошло за счёт резкого уменьшения доли грамположительных микроорганизмов.

Заключение. Доминирующее положение в биопленках отсепарированных свиных навозных стоков составляют грамположительные анаэробные микроорганизмы (81,49%), представленные преимущественно *Staphylococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Clostridium* spp.

Различные типы сурфактантов, применяемые в животноводстве, оказывают влияние на микробиоценоз биопленок навозных стоков.



Чувствительными к действию всех типов ПАВ оказались грамположительные *Staphylococcus epidermidis*, *Lactobacillus* ssp. и *Bifidobacterium* ssp., устойчивыми – *Clostridium* ssp. Под влиянием анионных ПАВ из навозных стоков полностью исчезли *Bacteroides* sp. и *Pseudomonas* spp., а количество *Fusobacterium* sp. не изменилось. Более эффективным в отношении грамотрицательных микроорганизмов свиных навозных стоков оказался именно анионный ПАВ. Менее результативным оказался катионный ПАВ, особенно в отношении *Klebsiella* sp. и *Prevotella* sp.

Использование различных типов ПАВ увеличило общее количество грибов с 17,33 до 53,18% от общего количества микроорганизмов, однако количество *Candida* sp. и *Aspergillus* ssp. практически не изменилось, а увеличение удельного веса грибов произошло за счет резкого уменьшения доли грамположительных микроорганизмов.

Список источников

1. Влияние различных типов поверхностно-активных веществ на эмиссию газов и микробиоту жидкой фракции навозных стоков / Л. В. Пилип, Н. В. Сырчина, Е. П. Колеватых, В. В. Рутман // Теоретическая и прикладная экология. 2023. № 3. С. 59-72. URL: <https://doi.org/10.25750/1995-4301-2023-3-059-072> 99 (дата обращения: 14.02.24).
2. Пилип Л. В., Сырчина Н. В. Роль аммонификаторов в эмиссии аммиака из свиных навозных стоков // Известия КГТУ. 2023. № 68. С. 46-54. URL: <https://doi.org/10.46845/1997-3071-2023-68-46-54> (дата обращения: 11.02.24).
3. Пилип Л. В. Анализ экологических рисков отрасли свиноводства в Кировской области // Вестник Вятской ГСХА. 2020. № 1 (3). С. 1.
4. Пилип Л. В., Сырчина Н. В., Ашихмина Т. Я. Промышленные свинокомплексы как источники загрязнения окружающей среды тяжелыми металлами // Известия Коми научного центра УрО РАН. 2021. № 5 (51). С. 88-91.



5. Производство биоорганических удобрений как направление реализации безотходных технологий в свиноводстве / А. В. Сазанов, Ю. Н. Терентьев, Н. В. Сырчина [и др.] // Теоретическая и прикладная экология. 2017. № 3. С. 85-90.
6. Рыбальченко О. В., Бондаренко В. М., Орлова О. Г. Ультраструктура микробных биопленок при межклеточных взаимоотношениях бактерий в сообществах // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2014. № 4. С. 87-92.
7. Сырчина Н. В., Пилип Л. В. Влияние подкисления на эмиссию сероводорода в органических отходах свинокомплексов // Проблемы региональной экологии. 2021. № 4. С. 102-106.
8. Сырчина Н. В., Шубин А. С., Береснева Т. П. Дезодорация свиного навоза, предназначенного для производства удобрений // Биодиагностика состояния природных и природно-техногенных систем : материалы XIV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. Киров : Радуга-ПРЕСС, 2016. С. 394-397.
9. Сырчина Н. В., Пилип Л. В., Ашихмина Т. Я. Химическая деградация земель под воздействием отходов животноводства // Теоретическая и прикладная экология. 2022. № 3. С. 219-225.
10. Трансформация микробиоты отходов животноводства под влиянием химических реагентов для устранения запаха / Е. П. Колеватых, Л. В. Пилип, Н. В. Сырчина [и др.] // Теоретическая и прикладная экология. 2022. № 4. С. 159-165. URL: <https://doi.org/10.25750/1995-4301-2022-4-159-165> (дата обращения: 17.02.24).
11. Худяков А. А. Эффективная дезинфекция и подбор дезинфектанта // Ветеринария Кубани. 2011. № 5. С. 26-28.
12. Cationic and anionic antimicrobial agents co-templated mesostructured silica nanocomposites with a spiky nanotopology and enhanced biofilm inhibition



performance / Y. Song, Q. Sun, J. Luo, Y. Kong, B. Pan, J. Zhao, Wang Yue & C. Yu // Nano-Micro Letters. 2022. V. 14. N 1. P. 83.

13. Goller C. C., Romeo T. Environmental influences on biofilm development // Bacterial Biofilms. 2008. V. 322. P. 37-66. URL: https://doi.org/10.1007/978-3-540-75418-3_3 (дата обращения: 11.02.24).

14. Metagenomic insights into taxonomic, functional diversity and inhibitors of microbial biofilms / M. Imchen, V. T. Anju, S. Busi, S. M. Mohan, P. Subhaswaraj, M. Dyavaiah., R. Kumavath // Microbiological Research. 2022. V. 265. P. 127207. URL: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127207> (дата обращения: 11.02.24)

15. Positive biofilms to guide surface microbial ecology in livestock buildings / V. Guéneau, J. Plateau-Gonthier, L. Arnaud, J. C. Piard, M. Castex, & Briandet // Biofilm. 2022. V. 4. P. 100075. URL: <https://doi.org/10.1016/j.bioflm.2022.100075> (дата обращения: 14.02.24).

16. Sun P., Gao M., Wu Y. Microflora of surface layers in aquatic environments and its usage // Clean water and sanitation. 2020. P. 1-9. URL: https://doi.org/10.1007/978-3-319-70061-8_95-1 (дата обращения: 10.01.24).

17. Synthetic and biological surfactant effects on freshwater biofilm community composition and metabolic activity / S. P. Gill, W. R. Hunter, L. E. Coulson, I. M. Banat, & J. Schelker // Applied Microbiology and Biotechnology. 2022. V. 106. N 106. P. 6847-6859. URL: <https://doi.org/10.1007/s00253-022-12179-4> (дата обращения: 12.02.24).

18. Vishwakarma V. Impact of environmental biofilms: industrial components and its remediation // Journal of Basic Microbiology. 2020. N 60. P. 198-206. URL: <https://doi.org/10.1002/jobm.201900569> (дата обращения: 12.02.24).

