

центра РАН. – 2017. – № 5. – С. 79–88. 4. Фармакологические способы профилактики стресс-индуцированных состояний в эксперименте / Т. И. Французова [и др.] // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. – 2010. – № 4 (16). – С. 26–35. 5. Этическая экспертиза биомедицинских исследований. Практические рекомендации / под ред. Ю. Б. Белоусова. – Москва : Изд-во ОКИ, 2005. – 156 с. 6. Geiser, F. Metabolic rate and body temperature reduction during hibernation and daily torpor / F. Geiser // Annu. Rev. Physiol. – 2004. – Vol. 66. – P. 239–274.

Статья передана в печать 20.01.2020 г.

УДК 628.349.094.3

## ВЛИЯНИЕ ОЗОНА НА МИКРОФЛОРУ СТОЧНЫХ ВОД СВИНОКОМПЛЕКСА

Чезлова О.Е., Волчек А.А.

Полесский аграрно-экологический институт НАН Беларуси, Брест, Республика Беларусь

Для изучения потенциальной эффективности дезинфекции озонированием осветленных сточных вод свиноводческого комплекса проведен эксперимент с использованием различных доз растворенного озона (10, 14, 18, 22, 26 мг/дм<sup>3</sup>). Бактерицидный эффект в группе общих колиформных бактерий составил до 0,24 лг, в группе термотолерантных колиформных бактерий – до 0,51 лг, энтерококков – до 0,60 лг, общего микробного числа – до 0,52 лг, для вегетативных форм сульфитредуцирующих клостридий – до 1,04 лг, для споровых форм – до 1,0 лг. Грамположительные бактерии сточных вод (сульфитредуцирующие клостридии, энтерококки) более чувствительны к озону, чем грамотрицательные (общие колиформные бактерии и термотолерантные колиформные бактерии). При озонировании в дозе 10 мг/дм<sup>3</sup> наблюдалась стимуляция роста на 50% для общих колиформных бактерий и термотолерантных колиформных бактерий. **Ключевые слова:** сточные воды, озонирование, дезинфекция, бактерии.

## INFLUENCE OF OZONE ON THE MICROFLORA OF WASTE WATER OF THE PIG COMPLEX

Chezlova O.E., Volchak A.A.

The Polesie Agrarian Ecological Institute of the NAS of Belarus, Brest, Republic of Belarus

To study the potential effectiveness of ozonation disinfection of clarified sewage from a pig breeding complex, an experiment was carried out using different doses of dissolved ozone (10, 14, 18, 22, 26 mg/dm<sup>3</sup>). The bactericidal effect in the group of common coliform bacteria amounted to 0,24 lg, in the group of thermo-tolerant coliform bacteria - up to 0,51 lg, enterococci - up to 0,60 lg, the total microbial number - up to 0,52 lg, for vegetative forms of sulfite-reducing clostridia - up to 1,04 lg, for spore forms - up to 1,0 lg, Gram-positive wastewater bacteria (sulfite-reducing clostridia, enterococci) are more sensitive to ozone than gram-negative (common coliform bacteria and thermotolerant coliform bacteria). With ozonation at a dose of 10 mg/dm<sup>3</sup>, growth stimulation of 50% was observed for common coliform bacteria and thermo-tolerant coliform bacteria. **Keywords:** sewage, ozonation, disinfection, bacteria.

**Введение.** При использовании любых методов утилизации навоза и навозосодержащих сточных вод (СВ) необходимо их гарантированное обеззараживание – уничтожение имеющихся в воде болезнетворных бактерий и устранение опасности заражения окружающей среды [1].

Существует значительное количество способов и методов обеззараживания СВ, включая химические, физические и биологические. Основными из них являются хлорирование, УФ-облучение, озонирование и др. Обеззараживание СВ озоном имеет ряд существенных преимуществ. При озонировании не образуются хлорорганических канцерогенных веществ, как при использовании хлора, при этом инактивация бактерий производится значительно быстрее. Облучение ультрафиолетовым светом имеет выраженный бактерицидный эффект, однако использование данного способа для дезинфекции осветленных стоков свинокомплексов не является экономически целесообразным из-за большого потребления энергии. Кроме того, озонирование, помимо бактерицидного эффекта, позволяет окислять органические вещества СВ, обуславливающие их токсичность, цветность и запах. Остаточный растворенный в воде озон полностью разлагается за 7–10 мин., а значит, в водоемприемник не поступает [2–4].

В настоящее время проведено много исследований эффективности инактивации микроорганизмов озоном. Указывается, что на нее оказывают влияние следующие факторы: pH, температура, наличие взвешенных и растворенных органических веществ, концентрация окислителя, концентрация микробных клеток и др. Устойчивый бактерицидный эффект наблюдается в широком интервале pH (от 5,6 до 9,8) и температуры (от 0 до 37°C) [5]. Так, по данным исследований в водном растворе озон приводит к гибели практически все виды грамположительных и грамотрицательных бактерий, вирусов, грибов, простейших, а также споры микроорганизмов и цисты простейших. Озон в концентрации от 1 до 5 мг/дм<sup>3</sup> приводит к гибели 99,9% *Micobacte-*

*rium tuberculosis*, *Escherichia coli*, *Streptococcus faecalis*, *Cryptosporidium parvum*, сальмонелл и других микроорганизмов в течение 4-20 мин. [6-10]. Пороговая концентрация озона составляет 0,4 мг на 1 л воды. Это означает, что при данной концентрации остаточного озона и продолжительности пребывания воды в контактной камере 4 мин. достигается 99,99%-ная инактивация микроорганизмов (4 lg) [5].

Количество озона, необходимое для обеззараживания СВ, зависит от степени ее загрязнения и составляет 1–10 мг/дм<sup>3</sup> при контакте в 8–15 мин. [11]. Для полного обеззараживания СВ после биологических очистных сооружений необходимая доза озона составляет 20–25 мг/дм<sup>3</sup> [5, 12]. Исследованиями [13] показано, что при дозе озона 100 мг/дм<sup>3</sup> эффективность инактивации бактерий в СВ свиноводческих ферм может достигать 3,3-3,9 lg. Ветеринарно-санитарные правила предполагают подбирать дозы вводимого озона в каждом конкретном случае. Однако в целом проведено недостаточное число исследований влияния озона на микрофлору животноводческих СВ, кроме этого, оценка воздействия озона часто представлена по одному показателю.

Целью данной работы было изучение потенциальной эффективности дезинфекции при озонировании осветленных СВ свиноводческого комплекса. Бактерицидное действие озона оценивали по показателям общего микробного числа (ОМЧ), общих колиформных бактерий (ОКБ), термотолерантных колиформных бактерий (ТКБ), энтерококков, сульфитредуцирующих кластридий.

**Материалы и методы исследований.** Для исследования использовались СВ из резервуара осветленных стоков (РОС) свиноводческого комплекса ОАО СГЦ «Западный». Образцы отобраны с глубины 0,3 м в 10 м от берега РОС. Отобранный образец помещали в стерильную бутылку и транспортировали в лабораторию в сумке-холодильнике при 4°C. Эксперименты по озонированию СВ проводили в день отбора проб в лаборатории кафедры водоснабжения, водоотведения и охраны водных ресурсов УО БрГТУ с помощью озонатора Platon 10/2 С, генерирующего озон из кислорода, вырабатываемого концентратором кислорода. Озоном насыщали дистиллированную воду и далее озонасыщенный раствор смешивали в необходимой пропорции с образцами СВ для достижения выбранных концентраций растворенного озона в единице объема стока: 10, 14, 18, 22, 26 мг/дм<sup>3</sup>. До бактериологического посева пробы выдерживали при 4°C в течение 2 часов для имитации неблагоприятных зимних температурных условий. В теплое время года ожидается высокая эффективность обеззараживания, поскольку реакции будут протекать быстрее. Опыт проводился в двух повторностях.

Определение бактериологических показателей проводилось в соответствии с методическими указаниями, утвержденными Минздравом Республики Беларусь [Инструкция № 037-0409, 2009; Инструкция № 025-0309, 2009]. Из контрольных и опытных образцов СВ готовились серии десятичных разведений и производился посев на диагностические среды в соответствии с избранным показателем.

Для определения ОКБ разведения СВ засеивали в пробирки с лактозо-пептонной средой. Посевы инкубировали 48 ч при (37±1)°С. При наличии газообразования и помутнения, а также изменения цвета среды производили высев на среду Эндо, после чего их помещали в термостат на 18–24 ч при температуре среды (37±1)°С. При наличии на поверхности среды Эндо малиновых с металлическим блеском или без него, красных и розовых колоний проводили микроскопию колоний с последующей постановкой оксидазного теста. При наличии грамотрицательных оксидазоотрицательных палочек по 2–3 колонии каждого типа засеивали параллельно в две пробирки с полужидкой средой с лактозой для подтверждения ферментации лактозы при температуре (37±1)°С. Термотолерантность культуры микроорганизмов оценивали по ферментации лактозы до кислоты и газа при температуре (44±0,5)°С.

При исследовании на энтерококк с жидкой среды накопления производили высев на Энтерококкагар с последующей микроскопией окрашенных по Граму мазков, постановкой каталазного теста, высеивом в среду с молоком с 0,1% метиленового синего и дифференциальную среду с эскулином.

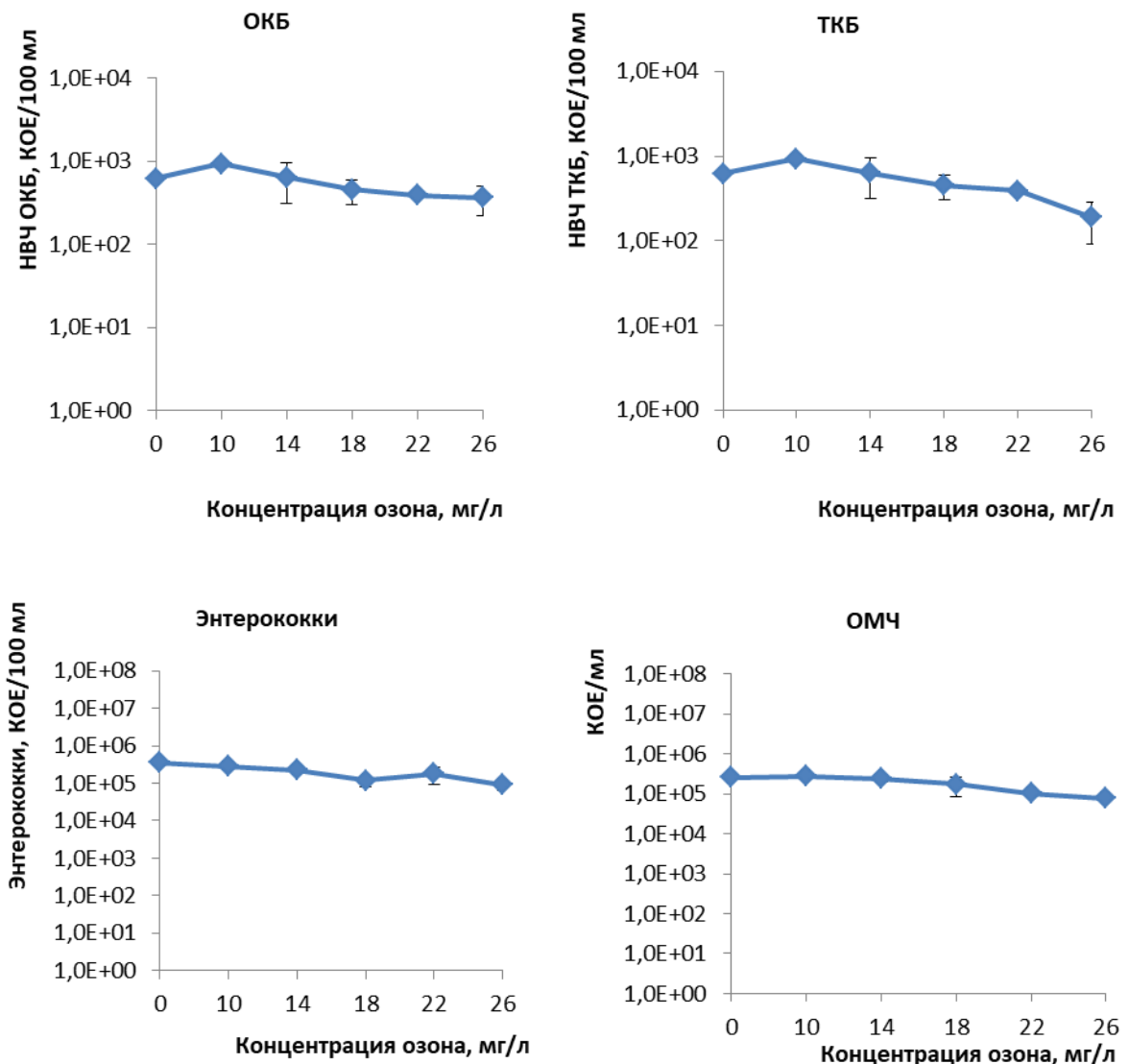
Определение спор сульфитредуцирующих кластридий проводили методом прямого посева. После прогревания при температуре (75±5)°С в течение 15 мин. образец СВ 20 мл засеивали на нагретый до 70-80°C железосульфитный агар. Термостатировали при температуре (44±1)°С 18-24 ч и производили учет черных колоний.

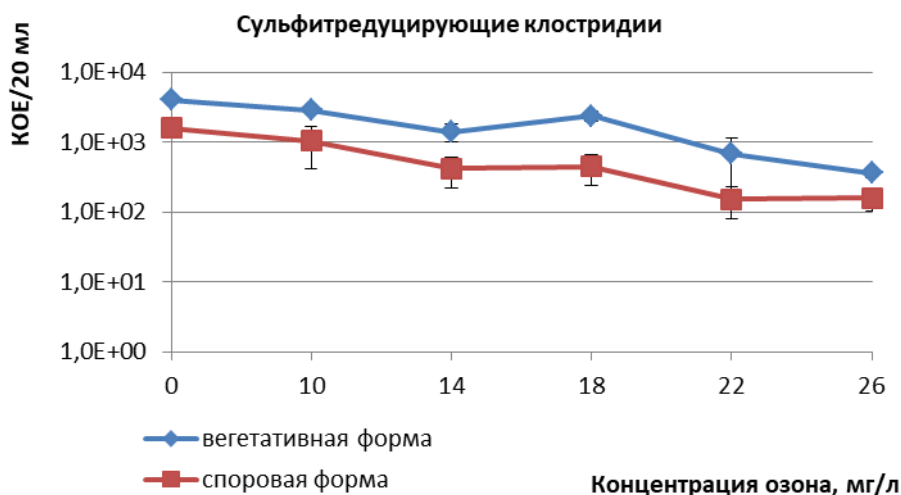
ОМЧ определяли количественным подсчетом всех выросших колоний микроорганизмов на мясопептонном агаре при культивировании посевов в аэробных условиях при температуре 37°C в течение 24 часов.

Результат выражался в наиболее вероятном числе (НВЧ) колониеобразующих единиц (КОЕ) в 100 мл (ОКБ, ТКБ), КОЕ в 100 мл (энтерококки), КОЕ в 20 мл (сульфитредуцирующие кластридии), КОЕ в 1 мл (ОМЧ). При подсчете количества бактерий учитывалось разбавление при озонировании.

**Результаты исследований.** Оценка эффективности дезинфекции при озонировании СВ может быть произведена по ряду показателей: степени инактивации микроорганизмов, величине полулетальной дозы, на основании анализа кинетики гибели микроорганизмов, продолжительности озонирования, величине остаточного озона в воде после инактивации и др. В данной работе эффективность инактивации выражалась в изменении количества бактерий в  $\lg N$ , где  $N$  – количество бактерий. Также определялась степень инактивации микроорганизмов в процентах.

На рисунке 1 отражено влияние возрастающих доз растворенного озона в СВ на количество бактерий различных групп санитарно-показательных микроорганизмов. Видно, что в выбранном диапазоне внесенного озона в СВ происходит постепенное снижение количества бактерий всех групп – для ОКБ снижение составило до 0,24  $\lg$ , для ТКБ – до 0,51  $\lg$ , для энтерококков – до 0,60  $\lg$ , для ОМЧ – до 0,52  $\lg$ . В наибольшей степени эффект снижения количества микроорганизмов был выявлен в группе сульфитредуцирующих клостридий – для вегетативных форм оно составило 1,04  $\lg$ , для споровых – 1,0  $\lg$ , что является вполне закономерным т.к. данный представитель микробиоты является строгим анаэробом. Однако нельзя назвать полученный результат удовлетворительным, т.к. ранее выявлено, что для гарантированного обеззараживания СВ число ОКБ в загрязненных СВ должно быть снижено в  $10^4$  раз (4  $\lg$ ) [11].





**Рисунок 1 – Изменение количества бактерий в СВ в зависимости от дозы озона**

При использовании наименьшей в эксперименте дозы озона 10 мг/л для некоторых групп бактерий наблюдалось увеличение количества бактерий – для ОКБ и ТКБ увеличение составило 0,17 lg, для ОМЧ – 0,03 lg. Кроме того, был отмечен стимулирующий эффект данной дозы озона, выразившийся у представителей ОКБ и ТКБ в изменении их культуральных свойств – колонии были более крупными, у них появился выраженный металлический блеск, что не отмечалось в контроле.

Эти результаты согласуются с проведенными исследованиями [6, 9, 14], в которых наблюдали стимулирующий эффект малых доз озона для бактерий *E. coli* и грибов *S. cerevisiae*. Для *E. coli* эта доза озона составила 0,3–0,5 мг/дм<sup>3</sup>. При этом происходила стимуляция роста микроорганизма на 20–22%. В нашем исследовании стимуляция роста ОКБ и ТКБ при дозе озона 10 мг/дм<sup>3</sup> произошла на 50%. Объяснением данному явлению могут служить несколько предположений. Одно из них: озон осуществляет трансформацию органических веществ до состояния, более податливого биоокислению, т.е. поставляет тем самым питательные элементы микроорганизмам, избежавшим его влияния. Второе сводится к тому, что в период озонирования окисляются различные фенольные группы и другие токсические вещества, в присутствии которых микроорганизмы находятся в подавленном состоянии, не проявляя активной жизнедеятельности. Разрушение их озонem, его полное разложение и наличие питательных элементов в воде создают условия для быстрого восстановления бактерий [15]. Кроме того, нельзя не учитывать непосредственное влияние озона на микроорганизмы. Известно явление гормезиса – стимуляция живой системы слабым внешним раздражителем, интенсивность которого недостаточна для проявления вредных воздействий [14-16]. Данный эффект необходимо учитывать в технологиях водоочистки.

На рисунке 2 продемонстрирована степень инактивации микроорганизмов при максимальной в эксперименте дозе озона – 26 мг/дм<sup>3</sup>. Она позволяет сравнить резистентность к озону различных групп санитарно-показательной микрофлоры. В целом, можно отметить, что озон интенсивнее инактивирует грамположительные бактерии (сульфитредуцирующие бактерии, энтерококки), чем грамотрицательные (ОКБ, ТКБ), что связано, по всей видимости, с разницей в строении клеточной стенки микроорганизмов, т.к. в первую очередь деструктивное действие озона направлено в отношении мембран [6].



**Рисунок 2 – Степень инактивации бактерий при озонировании СВ в дозе 26 мг/дм<sup>3</sup>**

Однако использовать такой критерий, как степень инактивации не всегда целесообразно для характеристики эффективности процесса обеззараживания, т.к. при степени инактивации, равной 90%, количество бактерий снижается лишь на 1 порядок, что в случае загрязненных бактериями СВ не всегда достаточно. Так, в нашем исследовании при степени снижения ОКБ на 42% в СВ оставалось  $3,6 \times 10^2$  НВЧ КОЕ/100 мл жизнеспособных бактерий этой группы, при степени снижения ТКБ, равной 68%, – оставалось  $1,9 \times 10^2$  НВЧ КОЕ/100 мл, что в 1,9 раз превышает норму для поверхностных вод по данному показателю. Для энтерококков степень снижения количества бактерий составила 75%, однако в обработанной озоном СВ их оставалось еще значительное количество –  $9 \times 10^4$  КОЕ/100 мл. Следовательно, для характеристики эффективности процессов дезинфекции лучше использовать показатель, отражающий порядок количества бактерий  $N - \lg N$ .

Недостаточно выраженный бактерицидный эффект озона в отношении СВ свиного комплекса связан с тем, что озон активно вступает во взаимодействие с органическими веществами, входящими в состав стоков, и концентрация свободного озона в системе снижается. В подтверждение этому в литературе имеются сообщения о жизнеспособности бактерий *E. coli*, суспендированных в различных жидких средах (дистиллированной воде, физиологическом растворе и мясо-пептонном бульоне (МПБ)) после обработки их озоно-кислородной смесью путем барботирования. Показано, что бактерии *E. coli*, суспендированные в МПБ, погибают медленнее, чем в двух других средах при тех же условиях, что связано с защитным действием органики. Также показано, что барботирование озоно-кислородной смесью суспензии бактерий приводит к более быстрой и значительной их гибели по сравнению с инкубацией клеток в озонированной среде. Это можно объяснить сохранением постоянной концентрации озона в первом случае и уменьшением его концентрации во втором [9].

Для усиления бактерицидного действия на бактерии СВ свиноводческого комплекса ОАО СГЦ «Западный» рекомендуется увеличить дозу озона до  $100 \text{ мг/дм}^3$ , что вряд ли является экономически целесообразным. Необходимо разрабатывать технологии, позволяющие снижать количество растворенных и взвешенных органических веществ в СВ и увеличивать доступность бактерий к действию озона. Перспективным является создание технологических схем, предполагающих совместное использование методов озонирования и ультразвука, ультрафиолетового облучения, электронного пучка и др. [17, 18].

**Заключение.** 1. При озонировании сточных вод свиноводческого комплекса ОАО СГЦ «Западный» дозами от 10 до  $26 \text{ мг/дм}^3$  снижение количества общих колиформных бактерий составило до 0,24 lg, термотолерантных колиформных бактерий – до 0,51 lg, энтерококков – до 0,60 lg, ОМЧ – до 0,52 lg, для вегетативных форм сульфитредуцирующих кластридий – до 1,04 lg, для споровых форм – до 1,0 lg, что является недостаточным для выраженного бактерицидного эффекта.

2. Грамположительные бактерии сточных вод (сульфитредуцирующие кластридии, энтерококки) более чувствительны к озону, чем грамотрицательные (общие колиформные бактерии и термотолерантные колиформные бактерии), что обусловлено различием в строении их оболочек.

3. При озонировании в дозе  $10 \text{ мг/дм}^3$  наблюдалась стимуляция роста на 50% для общих колиформных бактерий и термотолерантных колиформных бактерий, что необходимо учитывать при разработке технологий водоочистки.

**Литература.** 1. ТКП 45-3.04-8-2005. Мелиоративные системы и сооружения. Нормы проектирования : утв. Минстройархитектуры РБ от 01.11.2005, № 279. – 105 с. 2. Кузубова, Л. И. Химические методы подготовки воды (хлорирование, озонирование, фторирование) : анализ. обзор / Л. И. Кузубова, В. Н. Кобрина // СО РАН, ГННТБ, НИОХ. – Новосибирск, 1996. – 132 с. 3. Disinfection of Swine Wastewater Using Chlorine, Ultraviolet Light and Ozone / J. J. Macauley [et al.] // Water Research. – 2006. – Vol. 40, № 10. – P. 2017–2026. 4. Морозова, Е. М. Исследование способа обеззараживания сточных вод с помощью озона / Е. М. Морозова // Вестник государственного университета морского и речного флота им. адмирала С. О. Макарова. – 2011. – № 3. – С. 162–165. 5. Орлов, В. А. Озонирование воды / В. А. Орлов. – Москва : Стройиздат, 1984. – 88 с. 6. Белых, И. А. Стимулирующее действие малых доз озона на рост микроорганизмов / И. А. Белых, В. Д. Зинченко, И. П. Высеканцев // Проблемы криобиологии. – 2004. – № 4. – С. 41–45. 7. Burlison, G. R. Inactivation of viruses and bacteria by ozone, with and without sonification / G. R. Burlison, T. M. Murray, M. Pollard // Appl. Microbiol. – 1975. – Vol. 29. – P. 340–344. 8. Сравнительная оценка эффективности озонотерапии при стрептококковых инфекциях в зависимости от способа применения / Ф. Н. Алферина [и др.] // Материалы IV Всероссийской научно-практической конференции «Озон и методы эфферентной терапии в медицине». – Нижний-Новгород, 2000. – С. 111–112. 9. Токсическое действие озона на бактерии *Escherichia coli* / И. А. Белых [и др.] // Современные проблемы токсикологии. – Киев, 2009. – № 1. – С. 49–53. 10. Долина, Л. Ф. Новые методы и оборудование для обеззараживания сточных вод и природных вод / Л. Ф. Долина. – Д.: Континент, 2003. – 218 с. 11. Предозонирование – как средство интенсификации процессов биологической очистки сточных вод / А. А. Цхе [и др.] // Научный журнал КубГАУ. – 2013. – № 87. – С. 276–301. 12. Миков, А. Г. О возможности доочистки сточных вод после БОС методом озонирования / А. Г. Миков, А. Б. Соломонов // Экология и промышлен-

ность России. – 2011. – № 7. – С. 45–47. 13. *Disinfection of Swine Wastewater Using Chlorine, Ultraviolet Light and Ozone* / J. J. Macauley [et al.] // *Water Research*. – 2006. – Vol. 40, № 10. – P. 2017–2026. 14. Горячая, И. П. Устойчивость мембран дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* к холодовым воздействиям в условиях окислительного стресса / И. П. Горячая, В. Д. Зинченко, И. А. Буряк // *Научные ведомости БелГУ. Серия: Естественные науки*. – 2014. – № 3. – С. 72–78. 15. *Calabrese, E. J. Hormesis: principles and applications for pharmacology and toxicology* / E. J. Calabrese // *Am. J. Pharm. Toxicol.* – 2008. – Vol. 3, № 1. – P. 56–68. 16. *Vocci, V. Is it true that ozone is always toxic? The end of a dogma* / V. Vocci // *Toxicology and Applied Pharmacology*. – 2006. – Vol. 216, № 3. – P. 493–504. 17. Скляр, Н. И. Изменчивость остаточной санитарно-показательной микрофлоры природных и сточных вод после совместной обработки озоном и электронным пучком / Н. И. Скляр // *Вестник Харьковского национального университета имени В. Н. Каразина. Серия: Медицина*. – 2008. – № 16. – С. 27–33. 18. Шапиро, С. В. Комбинированный озонно-ультразвуковой очиститель оборотной воды : полезная модель 118629 Рос. Федерация : МПК С01В 13/11 / С. В. Шапиро, Т. А. Калева. – дата публ. : 27.07.2012.

Статья передана в печать 17.02.2020 г.