

# ГІГІЕНА ТВАРИН, ВЕТЕРИНАРНА САНІТАРІЯ, ЯКІСТЬ І БЕЗПЕКА ПРОДУКТІВ ТВАРИНИЦТВА

УДК 619:614.777:639.37/.331.5:574.64

## ПРОЦЕС ФОРМУВАННЯ МІКРОБНИХ БІОПЛІВОК НА РІЗНИХ НАПОВНЮВАЧАХ РЕАКТОРА БІОФІЛЬТРА В УСТАНОВКАХ ЗАМКНУТОГО ВОДОПОСТАЧАННЯ ПРИ ВИРОЩУВАННІ РАЙДУЖНОЇ ФОРЕЛІ

**Н. Є. Гриневич**, к.вет.н., доцент\*

**М. Д. Кухтин**, д.вет.н., професор\*\*

**В. І. Семанюк**, к.вет.н., доцент\*\*\*

\*Білоцерківський національний аграрний університет

\*\*Тернопільський національний технічний університет імені Івана Пулюя

\*\*\*Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій ім. С. З. Гжицького

Представлено мікробіоценоз реактора біофільтра, основу якого складають мікроорганізми, що живуть, як вільно плаваючі форми бактерій, які перебувають у планктонному стані, так і бактерії, що формують біоплівки на поверхнях реактора, тобто на наповнювачах. Саме від стану біоплівки сформованої нітрифікуючими і денітрифікуючими бактеріями на наповнювачах залежить ефективний процес утилізації органічних речовин, які накопичуються в процесі вирощування риби. З метою оцінки різних типів наповнювачів реактора біофільтра, тобто здатність їх до біологічного очищення (нітрифікації, денітрифікації), нами було досліджено процес формування біоплівки на наповнювачах під час запуску УЗВ (установки замкнутого водопостачання) за вирощування райдужної форелі.

У досліді використано чотири типи наповнювачів, які відбирали з реактора біофільтра через кожні п'ять днів протягом тридцяти п'яти денного періоду. У виробничих умовах під час запуску УЗВ упродовж 25 днів процес нітрифікації повинен стабілізуватися і вміст нітриту не повинен перевищувати межу в 1,5-2,0 мг/дм<sup>3</sup>, тобто ту, яка є токсичною для риб.

**Ключові слова:** реактор біофільтра, наповнювач, щільність біоплівки, матрикс, нітрифікація, денітрифікація, райдужна форель.

**Постановка проблеми у загальному вигляді.** Експлуатація сучасної установки замкнутого типу для вирощування цінних видів риб в умовах аквакультури дозволяє окупити вкладення в будівництво установки і витрати на її функціонування за використання найбільш цінних видів риб. Таким об'єктом є райдужна форель, саме темп її росту впливає на експлуатаційні витрати, відповідно і собівартість. Для індустріального типу форелевих господарств важливими критеріями залишається виживаємість об'єкта на всіх етапах вирощування та його невибагливість до умов утримання [5, 6].

Особливості використання біофільтрів в установках замкнутого водопостачання в аквакультурі показані у наших попередніх повідомленнях і свідчать, що наповнювачі біофільтрів відіграють одну з ключових ролей для підтримання оптимальних умов для роботи УЗВ [1, 2, 3]. Разом з цим досліджень як змінюється кількість мікроорганізмів, що беруть участь у процесах нітрогенного циклу і концентрація нітриту в воді реактора біофільтра УЗВ за використання різних наповнювачів ми не виявили у доступній нам літературі, а окремі повідомлення не висвітлюють поставленої проблеми і є розрізненими [4].

**Зв'язок з важливими науковими і практичними завданнями.** Дослідження є частиною комплексних наукових досліджень кафедри іхтіології та зоології Білоцерківського національного аграрного університету за тематичним планом науково-дослідної роботи «Обґрунтування та розроб-

лення системи санітарно-гігієнічних заходів в індустріальних форелевих господарствах України за замкнутого водопостачання». Державний реєстраційний номер 0116 У 005809

**Аналіз останніх досліджень та публікацій.** Необхідність економічного використання води у форелевих індустріальних господарствах спонукала до розробки методів ефективного водокористування, в тому числі запровадження систем оборотного водопостачання (СОВ) або установок замкнутого водопостачання із біофільтрацією води (УЗВ). За останнє десятиліття форелеві заводи орієнтуються саме на циркуляційні установки, так як тільки при такому способі досягається раціональне використання води і можливість регулювання та контролю умов довкілля [4]. У процесі роботи установок замкнутого водопостачання (УЗВ) поверхня завантажувального матеріалу (наповнювача) обростає біоплівкою, утвореною колоніями аеробних мікроорганізмів. Багато вчених, які займаються вивченням особливостей вирощування риби в індустріальних господарствах, вказують на важливу роль мікрофлори у санітарній практиці.

**Мета роботи** дослідити процес формування біоплівки на наповнювачах під час запуску УЗВ за вирощування райдужної форелі.

**Матеріали і методи досліджень.** В індустріальних форелевих господарствах в умовах УЗВ найчастіше використовують такі види наповнювача біофільтра: статичний керамзит; RK PLAST; AQ-25; KALDNER K1П, саме вони і були використані для дослідів.

Таблиця 1

**Характеристика різних видів наповнювача біофільтра**

Характеристика	Вид біонаповнювача			
	Статичний керамзит	RK PLAST	AQ-25	KALDNER K1П
матеріал з якого виготовлено наповнювач	глина	пропілен	поліпропілен високої щільності HDPE	поліпропілен високої щільності
корисна (робоча поверхня)	400 м <sup>2</sup> /м <sup>3</sup>	635 м <sup>2</sup> /м <sup>3</sup>	226 м <sup>2</sup> /м <sup>3</sup>	450 м <sup>2</sup> /м <sup>3</sup>
діаметр	15/25 мм	15/15 мм	25/25 мм	16/10 мм
вага	30 кг/м <sup>3</sup>	175 кг/м <sup>3</sup>	71 кг/м <sup>3</sup>	60 кг/м <sup>3</sup>

Для визначення щільності утворених біоплівки з реактора біофільтра після запуску УЗВ відбирали наповнювачі через 5-10-15-20-25-30-35 денного періоду. У стерильні чашки Петрі вносили по одній штуці наповнювача, відмивали їх стерильним фосфатним буфером тричі для змивання неприкріплених планктонних форм бактерій. Потім фіксували біоплівки етиловим спиртом упродовж 10-15 хв. Надалі наповнювач фарбували 0,1 % розчином кристалічного фіолетового упродовж 10-15 хв. Після цього у чашки вно-

сили 10,0 см<sup>3</sup> етилового спирту і залишали на 10-15 хв. Визначали оптичну густину промивного спирту на спектрофотометрі [4]. Електронно-мікроскопічні дослідження сформованих біоплівки на наповнювачі проводили на електронному растровому мікроскопі (РЕМ 106 И, Україна).

**Результати власних досліджень та їх обговорення.** Результати досліджень щільності мікробних біоплівки утворених на керамзитових наповнювачах наведено на рисунку 1.

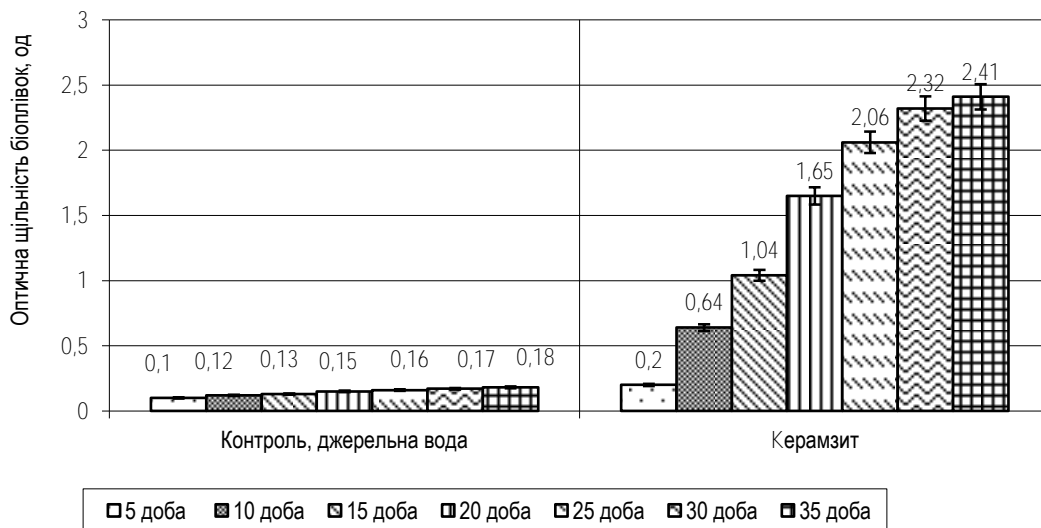


Рис. 1. Оптична щільність мікробних біоплівки сформованих на керамзитовому наповнювачу біофільтра під час запуску УЗВ для вирощування райдужної форелі.

Як видно з рисунку 1, протягом періоду дослідження до тридцяті доби щільність мікробних біоплівки на керамзитовому наповнювачі поступово збільшувалася. Найбільш інтенсивно біоплівки формувалися з п'ятої по двадцяту добу, протягом цього періоду їх щільність зросла в 8,2 раза ( $p < 0,05$ ). Упродовж наступних днів дослідження інтенсивність формування біоплівки знизилася, так як з двадцятого по тридцятий день її щільність зросла в 1,4 раза ( $p < 0,05$ ).

Практично на тридцятий день дослідження завершився процес формування біоплівки на керамзитовому наповнювачі. Упродовж наступного часу дослідження з тридцяті по тридцять п'яту добу щільність біоплівки достовірно не зросла і становила  $2,32 \pm 0,15$  і  $2,41 \pm 0,16$  од відповідно.

На рисунку 2 наведено динаміку формування мікробної біоплівки на поліпропіленовому наповнювачі RK PLAST.

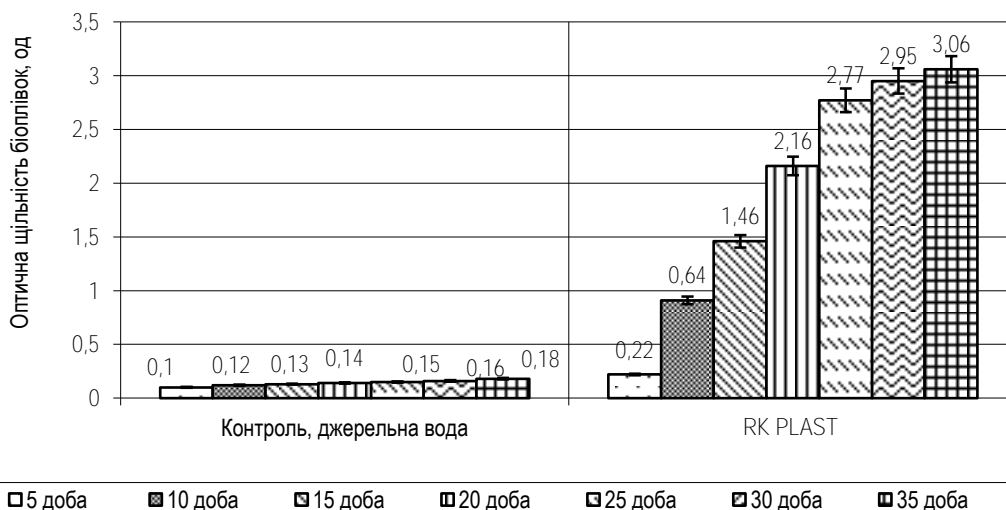


Рис. 2. Оптична щільність мікробних біоплівки сформованих на RK PLAST наповнювачу біофільтра під час запуску УЗВ для вирощування райдужної форелі.

Результати досліджень, які висвітлені на рисунку 2 виявили практично ті ж самі тенденції формування біоплівки на наповнювачі RK PLAST, як і на керамзитовому наповню-

вачі. Однак встановлені деякі, відмінності, які полягали у тому, що на наповнювачі RK PLAST щільність мікробних біоплівки зростала швидше. Це вказує на активну колоніза-

цію поліпропіленового наповнювача мікрофлорою, так як. В найбільш інтенсивний період розвитку біоплівки (з п'ятої по двадцяту добу) її щільність зросла в 9,8 раза ( $p < 0,05$ ). Надалі темпи формування біоплівки знизилися і на тридцяту добу досліді її щільність становила  $2,95 \pm 0,14$  од. практично, як і при використанні керамзитового наповнювача з тридцятої по тридцять п'яту добу щільність біоплівок на наповнювачі RK PLAST суттєво не зростала. Це вказує на те, що процес формування біоплівок на поліпропіленовому наповнювачі RK PLAST завершується до тридцятої доби запуску

УЗВ.

Таким чином, отримані дані вказують, що мікроорганізми води УЗВ при вирощуванні райдужної форелі краще колонізують наповнювач біофільтра RK PLAST, порівняно з керамзитовим наповнювачем, так як інтенсивність формування біоплівки в 1,3 раза швидша і щільність біоплівок в 1,3 раза вища ( $p < 0,05$ ).

На рисунку 3 наведено дані щодо щільності мікробних біоплівок сформованих на поліпропіленовому наповнювачі AQ -25.

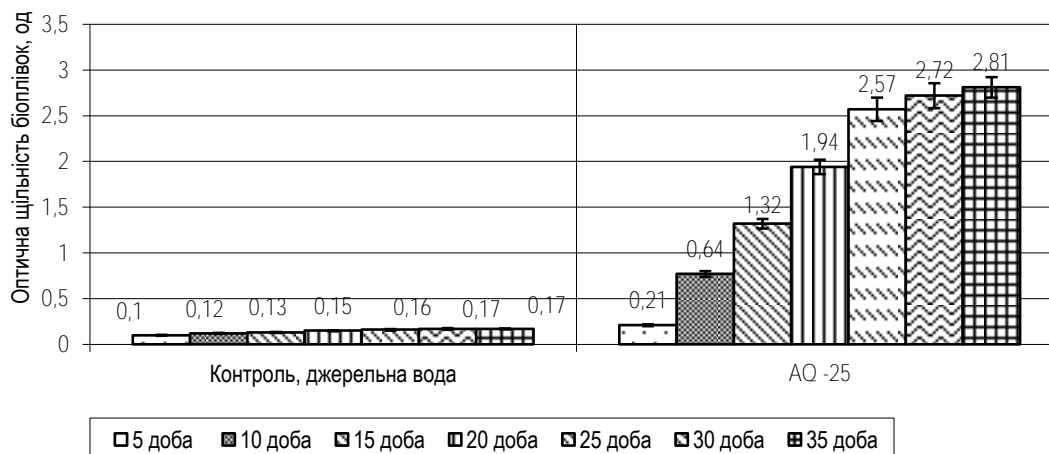


Рис. 3. Оптична щільність мікробних біоплівок сформованих на AQ-25 наповнювачу біофільтра під час запуску УЗВ для вирощування райдужної форелі.

Аналізуючи дані рисунку 3 необхідно відзначити наступне. Інтенсивність формування біоплівки на поліпропіленовому наповнювачі AQ-25 виявилася вищою, порівняно з керамзитовим наповнювачем, але нижчою, ніж на поліпропіленовому наповнювачі RK PLAST. Так, упродовж найбільш інтенсивного періоду (з п'ятої по двадцяту добу) формування біоплівки, її щільність зросла в 9,2 раза ( $p < 0,05$ ) і становила  $1,94 \pm 0,11$  од. У той же час за аналогічний період щільність біоплівок на керамзитовому наповнювачі зростала в

8,2 раза ( $p < 0,05$ ), а на наповнювачі RK PLAST у 9,8 раза ( $p < 0,05$ ). Також, дані вказують, що процес формування біоплівки на наповнювачі AQ-25 завершився на тридцяту добу з оптичною щільністю  $2,72 \pm 0,11$  од. Упродовж наступних п'ять днів досліді біоплівка практично не зростала і її щільність становила  $2,81 \pm 0,12$  од.

На рис.4. наведено результати досліджень оптичної щільності біоплівок з поліпропіленового наповнювача KALDNER K1П.

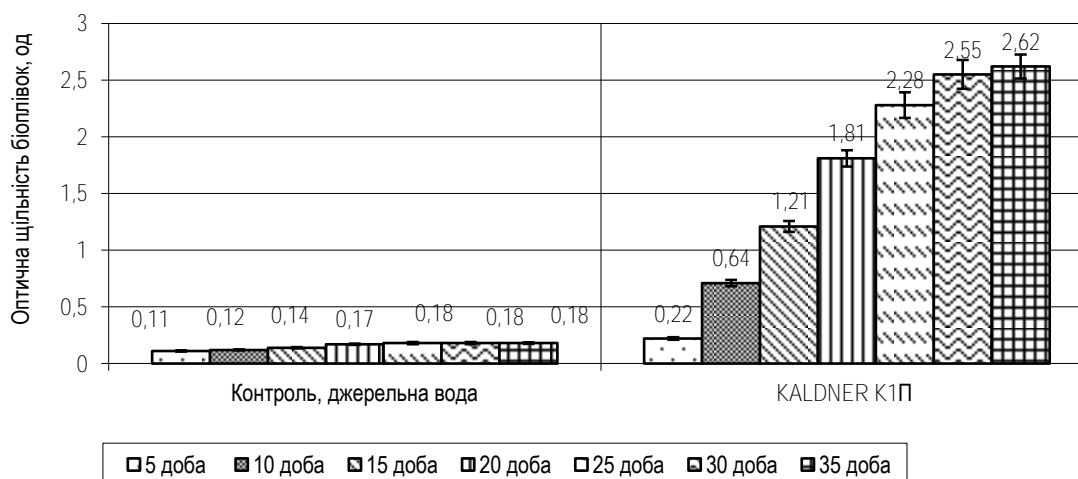


Рис. 4. Оптична щільність мікробних біоплівок сформованих на KALDNER K1П наповнювачу біофільтра під час запуску УЗВ для вирощування райдужної форелі.

3 даних рисунку 4 видно, що процес наростання щільності біоплівок на наповнювачі KALDNER K1П упродовж 35 днів досліді відповідав загальним закономірностям розвитку біоплівки, як і на інших типах наповнювачах. Проте на

KALDNER K1П-наповнювачі щільність мікробних біоплівок виявилася найнижчою серед трьох досліджених поліпропіленових наповнювачів. У період найбільш інтенсивного розвитку біоплівки до двадцятого дня запуску УЗВ, на

KALDNER K1П-наповнювачі оптична щільність біоплівки становила  $1,8 \pm 0,11$  од. У той же час як на RK PLAST –  $2,16 \pm 0,13$  од і  $1,94 \pm 0,11$  од на AQ-25 відповідно. На 30-35 день досліду щільність біоплівки на KALDNER K1П-наповнювачі становила 2,55-2,67 од, в той же час біоплівки практично такої щільності на наповнювачах RK PLAST і AQ-25 були на 25 день запуску УЗВ.

Формування мікроорганізмами виділених з наповню-

вачів біофільтра біоплівки високої щільності вказує на наявність значних адгезивних властивостей та продукування великої кількості екзополісахаридного матриксу, який в свою чергу забезпечує захист мікробних клітин від чинників навколишнього середовища (хімічних, фізичних).

На рисунку 5 (а, б) наведено результати електронної мікроскопії стадій формування біоплівки бактеріями *Pseudomonas* spp. виділених з поліпропіленових наповнювачів.

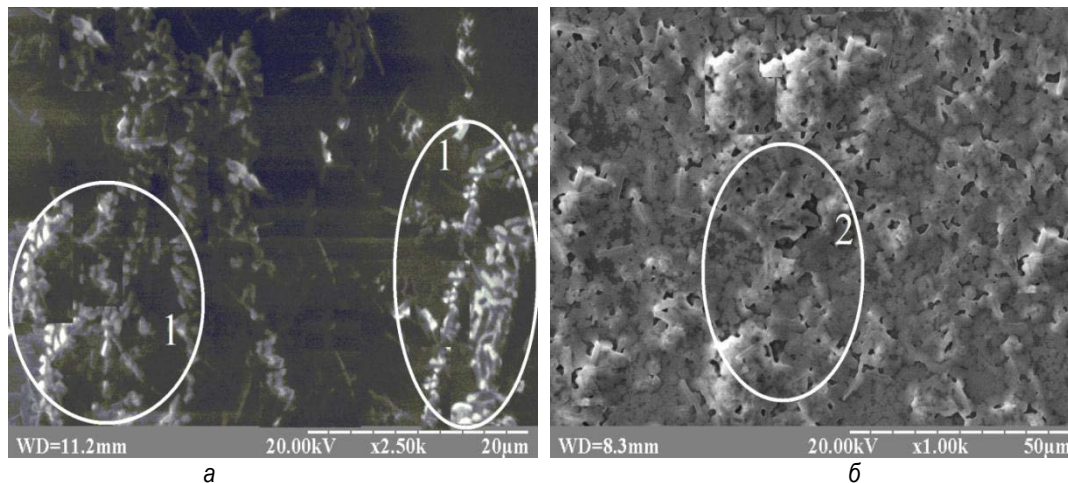


Рис. 5 (а, б). Стадії формування мікробної біоплівки клітинами *Pseudomonas* spp., яка виділена з наповнювачів біофільтра:  
1 – клітини у сформованій біоплівці (початкова стадія формування біоплівки 10 день запуску УЗВ);  
2 – Клітини у суцільному матриці біоплівки (завершальна стадія формування біоплівки 25 день запуску УЗВ).  
(Мікроскопія на електронному растровому мікроскопі РЕМ 106 И, Україна).

Як видно з рисунку 5 а, на початковій стадії клітини тільки починають продукувати захисний матрикс біоплівки, а більшість мікроорганізмів ще знаходяться у планктонній (неприкріпленій) формі. Надалі вони повністю окутані біоплівкою і захищені від факторів навколишнього середовища (рис. 5 б).

Отже, проведені дослідження вказують на те, що мікрофлора води реактора біофільтра заселяє наповнювач і формує на ньому біоплівки різної щільності. Процес формування щільних біоплівок залежав від виду наповнювачів. Найщільніші біоплівки мікроорганізми формували на поліпропіленових наповнювачах RK PLAST, дещо нижчої щільності на AQ-25 і KALDNER K1П. Біоплівки найнижчої щільності

формувалися на керамзитових наповнювачах. Дослідження також виявили, що біоплівки високої щільності (більше 2,0 од) формувалися на наповнювачі RK PLAST починаючи з 20 доби запуску УЗВ, на наповнювачах AQ-25 і KALDNER K1П біля 25 доби, а на керамзитовому наповнювачі з 30 доби. Ймовірно процес нітрифікації в реакторі біофільтра залежить від щільності мікробних біоплівок. Тому за показником щільності мікробних біоплівок можна судити про інтенсивність перебігу нітрифікуючих процесів у біофільтрі. Враховуючи отримані дані, щодо формування мікрофлорою УЗВ при вирощуванні райдужної форелі біоплівок на наповнювачах різних видів, ми пропонуємо оцінювати стан біоплівки наповнювача за такою шкалою таблиці 2.

Таблиця 2

#### Оцінка нітрифікуючої здатності мікрофлори наповнювача реактора біофільтра за показником щільності мікробних біоплівок

Щільність мікробних біоплівок	Оптична густина спиртового промивного розчину з біоплівок при спектрофотометрії, од
Низька	до 2,00
Середня	2,01 – 2,50
Висока	2,51 і вище

За величини щільності мікробної біоплівки наповнювача до 2,00 од (низька біоплівка) у воді басейну для риб вміст нітритів буде високий і проявляється токсичний вплив їх на організм. За такої щільності біоплівки необхідно контролювати рівень нітритів і застосовувати заходи щодо відновлення або стимулювання розвитку мікробіоценозу біофільтра.

За величини щільності біоплівки наповнювача від 2,01-2,50 в реакторі біофільтра розпочинається інтенсивний нітрифікуючий процес внаслідок чого кількість нітритів у воді басейну буде стрімко знижуватися. Це вказує на задовільний стан біоплівки і добру активність та розвиток нітрифіку-

ючих мікроорганізмів.

За величини щільності біоплівки від 2,50 і вище стан біоплівки відмінний, що вказує на максимальну активність нітрифікуючих мікроорганізмів.

**Висновки.** 1. Встановлено, що процес формування щільних біоплівок залежав від виду наповнювачів. Найщільніші біоплівки мікроорганізми формували на поліпропіленових наповнювачах RK PLAST, дещо нижчої щільності на AQ-25 і KALDNER K1П. Біоплівки найнижчої щільності формувалися на керамзитових наповнювачах.

2. Виявлено, що біоплівки високої щільності (більше 2,0 од) формувалися на наповнювачі RK PLAST починаючи

з 20 доби запуску УЗВ, на наповнювачах AQ-25 і KALDNER K1П з 25 доби, а на керамзитовому наповнювачі з 30 доби.

3. Запропоновано оцінювати стан біоплівки наповнювача реактора біофільтра за такою шкалою: до 2,00 од – низька біоплівка, біофільтр не виконує в повній мірі нітрифікуючі властивості; від 2,01 до 2,50 – середньої щільності біоплівка – в біофільтрі проходить задовільний нітрифікуючий процес; більше 2,51 – високої щільності біоплівка – в біофільтрі проходить максимальний нітрифікуючий процес.

чий процес; більше 2,51 – високої щільності біоплівка – в біофільтрі проходить максимальний нітрифікуючий процес.

**Перспективи подальших досліджень.** Дослідження з даної проблеми у подальшому дозволять удосконалити технологію використання наповнювачів реактора біофільтра залежно від стану щільності біоплівки та проходження нітрифікуючого процесу.

#### Список використаної літератури:

1. Гриневич Н. Є. Особливості використання біофільтрів з різними типами наповнювача в установках замкнутого водопостачання в аквакультурі. *Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С.З. Гжицького*. 2016. № 3, т. 18, (70). С. 57-61.
2. Гриневич Н. Є. Вміст нітрифікуючих організмів у воді реактора біофільтра установок замкнутого водопостачання за використання різних типів наповнювача. *Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С.З. Гжицького*. 2017. № 82, т. 19. С.184-187.
3. Grynevych, N; Dyman, T; Kukhtyn, M; Semaniuk, N Composition of psychrotrophic microflora of water and biofilter filler in recirculation aquaculture system on trout farm. *Research journal of pharmaceutical biological and chemical sciences*. 2017. № 8 (3). P. 900-905.
4. Kukhtyn M., Berhilevych O., Kravcheniuk K., Shynkaruk O., Horiuk Y. Formation of biofilms on dairy equipment and the influence of disinfectants on them. *Eastern-European Journal of Enterprise Technologies*. 2017; № 5(11). P. 26-33.
5. Кононенко Р. В. Використання установки замкнутого водопостачання за інтенсифікації виробництва рибопродукції. *Рибогосподарська наука України*. 2013. № 2. С. 56-65.
6. Спосіб створення мікробіоценозу біофільтра форелевого інкубатора: пат. 121437 Україна: МПК А01К 61/17 (2017.01) № у 2017 04747; заявл. 17.05.2017; опубл. 11.12.2017, Бюл. № 23.

#### References:

1. Grynevych N. (2016), "Features of using biofilters with different types of filler in closed water supply plants in aquaculture" [Osoblyvosti vykorystannja biofiltriv z riznymy typamy napovnjuvača v ustanovkax zamknuтого vodopostačannja v akvakulturi], *Scientific herald of LNUWMBT named after S.Z. Gzhytsky* No.3, vol. 18, (70), pp. 57-61. (in Ukrainian)
2. Grynevych N. (2017), "The content of nitrification of organisms in the water of a biofilter reactor for the installation of closed water supply for the use of different types of filler" [Vmist nityfikujučyx orhanizmiv u vodi reaktora biofil'tra ustanovy zamknuтого vodopostačannja za vykorystannja riznyx typiv napovnjuvača], *Scientific herald of LNUWMBT named after S.Z. Gzhytsky* No. 82, t. 19, pp.184-187. (in Ukrainian)
3. Grynevych, N. (2017), "Composition of the psychrotrophic microflora of water and biofilter filler in the recirculation aquaculture system in the trout farm", *Research journal of pharmaceutical biological and chemical sciences*. No. 8 (3), pp. 900-905.
4. Kukhtyn M., Berhilevych O., Kravcheniuk K., Shynkaruk O. and Horiuk Y., (2017), "Formation of biofilms on dairy equipment and the influence of disinfectants on them", *Eastern European Journal of Enterprise Technologies*.; No. 5 (11). pp. 26-33.
5. Kononenko R. (2013), "The use of closed water supply facilities for intensifying the production of fish products" [Vykorystannja ustanovy zamknuтого vodopostačannja za intenyfikaciji vyrobnyctva ryboprodukciji], *Fishery science of Ukraine*. №2. pp. 56-65. (in Ukrainian)
6. *The methods of microbiocenosis creation of a trout incubator biofilter* [Sposib stvorennja mikrobiocenozy biofil'tra forelevoho inkubatora]: Pat. 121437 Ukraine: IPC A01K 61/17 (2017.01) No. u 2017 04747; stated. May 17, 2017; has published 11.12.2017, Bul. №23. (in Ukrainian)

**Гриневич Н. Е., Кухтин Н. Д., Семанюк В. И. Процесс формирования микробных биопленок на различных наполнителях реактора биофильтров в установках замкнутого водоснабжения при выращивании радужной форели.**

Представлены микробиоценоз реактора биофильтра, основу которого составляют микроорганизмы, живущие, как свободно плавающие формы бактерий, находящихся в планктонных состоянии, так и бактерии, формирующие биопленки на поверхностях реактора, то есть на наполнителях. Именно от состояния биопленки сложившейся нитрифицирующих и денитрифицирующими бактериями на наполнителях зависит эффективный процесс утилизации органических веществ, которые накапливаются в процессе выращивания рыбы. С целью оценки различных типов наполнителей реактора биофильтра, то есть способность их к биологической очистки (нитрификации, денитрификации), нами были исследованы процесс формирования биопленки на наполнителях при запуске УЗИ (установки замкнутого водоснабжения) за выращивание радужной форели.

В опыте использовано четыре типа наполнителей, которые отбирали из реактора биофильтра через каждые пять дней в течение тридцати пяти дневного периода. В производственных условиях при запуске УЗИ в течение 25 дней процесс нитрификации должен стабилизироваться и содержание нитритов не должен превышать предел в 1,5-2,0 мг/дм<sup>3</sup>, то есть тот, который является токсичным для рыб.

**Ключевые слова:** реактор биофильтра, наполнитель, плотность биопленки, матрикс, нитрификация, денитрификация, радужная форель

**Grynevych N., Kukhtyn M., Semaniuk V. The process of microbial biofilms formation on various biofilter reactor fillers in closed water supply systems when growing rainbow trout.**

The microbiocenosis of the biofilter reactor, the basis of which are the microorganisms living as free-floating forms of bacteria in the planktonic state, as well as the bacteria forming biofilms on the surfaces of the reactor, that is, on the fillers, are made up of the microorganisms. It is from the state of the biofilm that the nitrifying and denitrifying bacteria formed on the fillers depend on the efficient process of the utilization of the organic substances that accumulate in the process of fish growing. In order to evaluate the different types of biofilter reactor fillers, i.e. their ability to the biological purification (nitrification, denitrification), we have investigated the process of the biofilms forming on the fillers during the launch of RAS (closed water supply) for the growing of the rainbow trout.

The study used four types of fillers that were taken from the biofilter reactor every five days during the thirty-five day period. In the production conditions, during the start of RAS within 25 days, the process of the nitrification must stabilize and the content of nitrites should not exceed the limit of 1.5-2.0 mg/dm<sup>3</sup>, which is toxic to fish.

**Keywords:** biofilter reactor, filler, biofilm density, matrix, nitrification, denitrification, rainbow trout.

Дата надходження до редакції: 31.01.2018 р.

Рецензент: д.вет.н., професор Фотіна Т. І.