

Элиминация фекальных индикаторных бактерий в почвах при многократном поливе животноводческими стоками

© 2021. О. Е. Чезлова¹, н. с., А. А. Волчек², д. г. н., профессор, декан,

¹Полесский аграрно-экологический институт НАН Беларуси, 224020, Республика Беларусь, г. Брест, ул. Советских пограничников, д. 41,

²Брестский государственный технический университет, 224017, Республика Беларусь, г. Брест, ул. Московская, д. 267, e-mail: olgachezlova@tut.by, Wolchak@tut.by

Оценена динамика отмирания *Escherichia coli*, бактерий группы кишечной палочки (БГКП) и энтерококков в сельскохозяйственных почвах при поливе сточными водами свиного комплекса нормами 90, 180 и 270 м³/га трижды в течение вегетационного периода. К концу периода по показателям БГКП и энтерококков гигиенический норматив превышен на 2 порядка при нормах 180 и 270 м³/га. Для описания динамики численности микроорганизмов использована аппроксимация первого порядка. Определены время 90%-ной элиминации и константы скорости отмирания бактерий. Для первого полива стоками регрессионные зависимости имели преимущественно высокий коэффициент детерминации от 0,7 до 0,9. Наибольшая скорость отмирания отмечалась у *E. coli*: константа отмирания k находилась в диапазоне от 0,129 до 0,253 день⁻¹ и время 10-кратного сокращения численности от 17,9 до 10,4 дней при нормах полива 90 и 180 м³/га соответственно. Для энтерококков параметр k варьировал от 0,092 до 0,149 день⁻¹, а время 90%-ной элиминации от 25,1 до 15,4 дней при нормах полива 90 и 270 м³/га соответственно. Для БГКП при поливе нормой 90 м³/га $k = 0,131$ день⁻¹, а время 90%-ной элиминации 17,6 дня. К третьему поливу стоками скорость элиминации *E. coli*, энтерококков и БГКП снижалась – константа k уменьшалась в среднем в 4,45; 3,79 и 2,12 раза соответственно. Для адекватного описания динамики фекальных индикаторных бактерий в почвах земледельческих полей орошения необходимо учитывать климатические, почвенные факторы, объём внесения стоков и др.

Ключевые слова: санитарно-показательные бактерии, полив сточными водами, модели.

Elimination of fecal indicator bacteria in soils at repeated irrigation with livestock waste

© 2021. O. E. Chezlova¹ ORCID:0000-0003-2314-3605, A. A. Volchak² ORCID: 0000-0002-8838-797X^{*}

¹The Polesie Agrarian Ecological Institute of the NAS of Belarus, 41, Sovetskikh pogranichnikov St., Brest, Belarus, 224020,

²Brest State Technical University, 267, Moskovskaya St., Brest, Belarus, 224017, e-mail: olgachezlova@tut.by, Wolchak@tut.by

To determine the survival time of fecal indicator bacteria (coliform bacteria, *Escherichia coli* and enterococci) in soils, a field experiment was conducted on sod-podzolic gley soil on cohesive sand when disposing of wastewater from livestock farms. During the field season, wastewater was introduced three times by the norms of 90, 180 and 270 m³/ha. By the end of the vegetation period, the content of coliform bacteria in the soil using the norms of 180 and 270 m³/ha is $2.17 \cdot 10^2$ and $2.16 \cdot 10^2$ CFU/g, respectively; the number of enterococci is $3.94 \cdot 10^2$ CFU/g and $2.17 \cdot 10^2$ CFU/g, respectively. To describe the dynamics of the number of microorganisms, a first order approximation was used. During the first irrigation with wastewater, the highest withering rate was observed in *E. coli*: the extinction constant k was in the range 0.129 to 0.253 day⁻¹, and the time of a 10-fold reduction in numbers was from 17.9 to 10.4 days with irrigation rates of 90 and 180 m³/ha, respectively. For enterococci, the parameter k ranged from 0.092 to 0.149 day⁻¹, and the time of 90% elimination ranged from 25.1 to 15.4 days with irrigation rates of 90 and 270 m³/ha, respectively. For coliform bacteria with a watering rate of 90 m³/ha, $k = 0.131$ day⁻¹, and the time of 90% elimination is 17.6 days. By the third irrigation with wastewater, the rate of elimination of *E. coli*, enterococci and coliform bacteria decreased – the constant k decreased by an average of 4.45, 3.79 and 2.12 times, respectively. For an adequate description of the dynamics of indicator bacteria in soils, it is necessary to take into account climatic, soil factors, the amount of wastewater, etc.

Keywords: sanitary-indicative bacteria, sewage irrigation, models.

Полив сельскохозяйственных полей орошения (ЗПО) сточными водами (СВ) животноводческих комплексов, что является преимущественным способом утилизации данных отходов в Беларуси, зачастую приводит к длительному загрязнению почв и поверхностных вод фекальными бактериями, потенциально способными вызывать заболевания у людей [1]. В зависимости от климатических, гидрогеологических и агротехнических факторов стоки могут быть внесены в почву однократно или многократно в течение вегетационного периода. Для нормирования антропогенной нагрузки необходимо определить сроки выживания патогенной микробиоты в почвах сельхозугодий, что затруднительно в связи с небольшим её количеством во внешней среде, неравномерностью распределения, отмиранием [2]. Как показали исследования, *Escherichia coli* и энтерококки являются индикаторными микроорганизмами (МО), имеющими наибольшую степень ассоциации со вспышками заболеваний желудочно-кишечного тракта [3]. Также традиционно исследуется количество бактерий группы кишечной палочки (БГКП).

В природных экосистемах происходит постепенное отмирание фекальных (патогенных и условно-патогенных) МО, адаптированных к жизни в организмах животных и человека. Тем не менее многие бактерии, оказавшись в природных экосистемах, становятся их постоянными обитателями [4].

В почве наблюдается рост количества бактерий в 1,5–2 раза сразу после внесения животноводческих СВ. Общее количество бактерий таких почв может превышать 10^6 , а содержание БГКП – 10^3 КОЕ/г. Показано, что *E. coli*, *Salmonella* sp., *Campylobacter* spp., *Enterococcus* spp. могут выживать в орошённых СВ почвах более одного года [5, 6]. Большая вариабельность выживаемости *E. coli* наблюдается при удобрении почвы навозом – от нескольких суток до нескольких месяцев [7–9]. Отмечено, что в сухой супесчаной почве количество *E. coli* достигало значения менее 10 КОЕ/г через 100 дней, а в глинистой почве – через 200 дней [10].

В практических целях при описании отмирания патогенных и индикаторных бактерий обычно используется уравнение аппроксимации первого порядка [11, 12]:

$$N_t = N_0 \cdot \exp(-kt), \quad (1)$$

где N_t – количество бактерий в момент времени t , КОЕ/г; N_0 – количество бактерий

в начальный момент времени, КОЕ/г; k – константа отмирания первого порядка (день⁻¹); t – прошедшее время (день).

Однако большинство исследований отмирания бактерий были проведены в лабораторных экспериментах, что затрудняет применение полученных результатов для естественных условий [3].

Целью данной работы явилась оценка отмирания колиформных бактерий, *E. coli* и энтерококков в сельскохозяйственных почвах при внесении в неё стоков свиноводческого селекционно-гибридного центра (СЦГ) «Западный» трижды в течение вегетационного периода тремя поливными нормами.

Материалы и методы исследования

Объектами исследования являлись СВ и почвы сельхозугодий СЦГ «Западный», а также МО стоков и почв. На СЦГ «Западный» ежедневно образуется около 1000 м³ СВ. Сточные воды содержат: общих колиформных бактерий – $2,19 \cdot 10^4$, термотолерантных колиформных бактерий – $8,45 \cdot 10^2$, энтерококков – $2,8 \cdot 10^4$ КОЕ/100 мл. Численность представителей сем. Enterobacteriaceae в титрах: *E. coli* – 0,01–0,001; *Citrobacter freundii* – 0,1; *Proteus vulgaris* – 0,01; *Providencia alcalifaciens* – 0,1; *Pantoea agglomerans* – 0,1–1 [13].

Для определения динамики отмирания фекальных бактерий в почвах ЗПО в вегетационный период 2016 г. проведён мелкоделяночный полевой опыт на участке пастбища, не удобрявшимся более 3 лет. В эксперименте использовано 3 поливные нормы СВ: 90, 180 и 270 м³/га. В данной работе отражены результаты 2-го года исследований. Годом ранее стоки вносились однократно по той же схеме. Почва исследуемого участка дерново-подзолистая глееватая на связном песке. Площадь делянки 1 м². Повторность трёхкратная. Сообщество многолетних трав включало овсяницу тростниковую, ежу сборную, клевер луговой. За вегетационный сезон было произведено 3 полива СВ указанными выше нормами (апрель, май, июль). Пробы для микробиологического анализа, отобранные стерильным инструментом в стерильные полиэтиленовые пакеты по ГОСТ 17.4.4.02-84, доставляли в течение 2 ч в лабораторию и до начала исследования хранили в холодильнике (не более суток). В работе использовали стандартные методики бактериологического анализа [14]. Из отобранных почв с соблюдением условий стерильности готовили серии десятичных

разведений для посева на селективные и не-селективные питательные среды в соответствии с показателем. Расчёт количества МО производился на 1 г абсолютно сухой почвы.

Для определения БГКП почвенные суспензии сеяли на среды лактозо-пептонную и Эндо. Затем следовала инкубация посевов в термостате в течение 18–24 ч при температуре 37 ± 1 °С. При обнаружении грамотрицательных оксидазоотрицательных палочек производили посев в полужидкую среду с лактозой. Дополнительно оценивали термотолерантные свойства МО по признаку ферментации лактозы при температуре 44 ± 1 °С. Дифференциацию *E. coli* проводили по комплексу биохимических признаков [14, 15].

Для определения энтерококков использовали прямой посев почвенных суспензий на среду энтерококкагар. Засеянные чашки инкубировали при температуре 37 ± 1 °С в течение 44–48 ч. Для подтверждения роста энтерококков делали каталазный тест и микроскопию окрашенных по Граму мазков.

Данные результатов эксперимента обрабатывали с помощью стандартных методик [16].

Результаты и обсуждение

В результате трёх поливов животноводческими стоками в течение вегетационного

периода наблюдались изменения динамики численности микробиоты почв ЗПО (рис. 1–3).

Наибольшее количество БГКП обнаружено после третьего полива СВ при максимальной в опыте норме СВ $270 \text{ м}^3/\text{га} - 1,36 \cdot 10^3 \text{ КОЕ}/\text{г}$. К концу вегетационного периода содержание БГКП остаётся повышенным при использовании норм 180 и $270 \text{ м}^3/\text{га}$ – соответственно $2,17 \cdot 10^2$ и $2,16 \cdot 10^2 \text{ КОЕ}/\text{г}$, что на 2 порядка превышает гигиенический норматив для «чистой» почвы ($1-9 \text{ КОЕ}/\text{г}$). Разница с контролем оказалась статистически значимой (при уровне значимости $p = 0,05$) при нормах 180 и $270 \text{ м}^3/\text{га}$ и не значимой при $90 \text{ м}^3/\text{га}$.

Содержание термотолерантной *E. coli* в поливных СВ было значительным – до титра 0,01 мл. Её численность возрастала в почвах поливаемых участков. Однако если после первого полива СВ кишечная палочка обнаруживается только через 5 и 14 дней после полива СВ (за исключением варианта полива СВ $270 \text{ м}^3/\text{га}$ – через месяц её количество в почве наблюдалось на уровне $40 \text{ КОЕ}/\text{г}$), то во второй и третий полив *E. coli* встречается во всех вариантах до 2-го месяца после внесения, что связано с высокой активностью ризосферы многолетних трав в начале вегетационного периода [17], более благоприятными погодноклиматическими условиями. Через 2 месяца после 3-го полива СВ нормой $270 \text{ м}^3/\text{га}$ *E. coli*

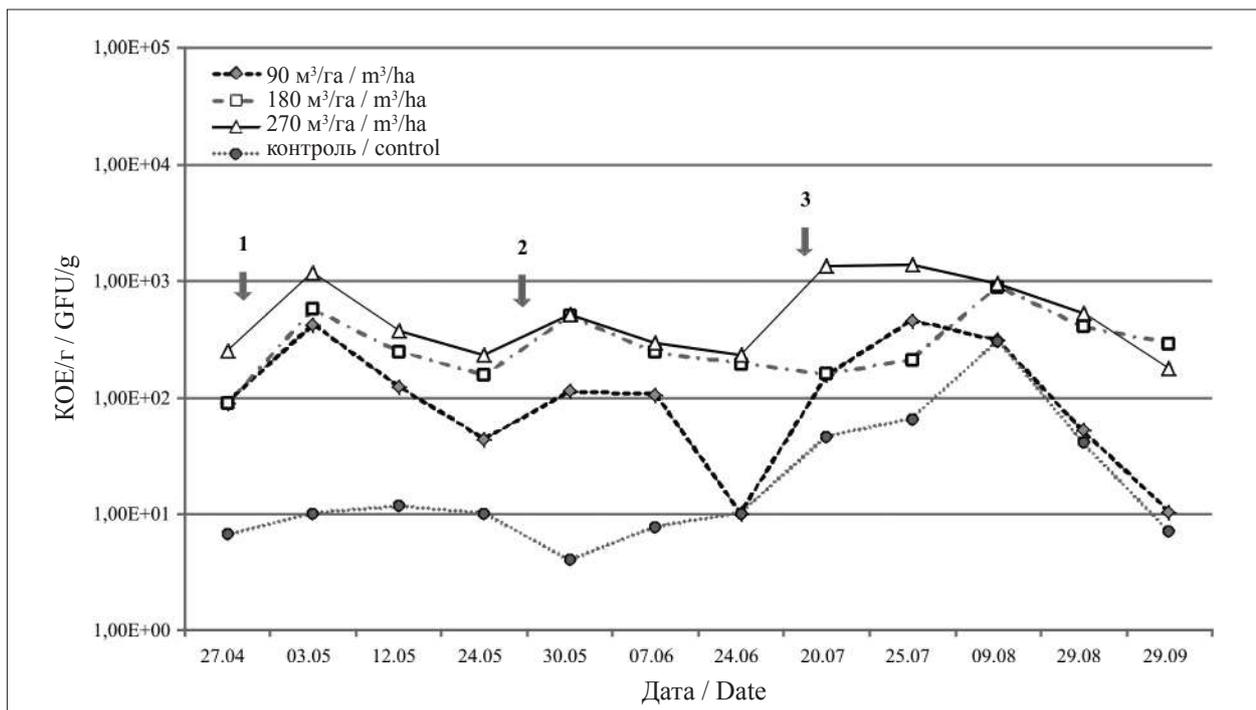


Рис. 1. Динамика колиформных бактерий в почвах полевого участка:
1 – 1-й полив СВ; 2 – 2-й полив СВ; 3 – 3-й полив СВ

Fig. 1. The dynamics of coliform bacteria in the soils of the field site:
1 – 1st watering sewage; 2 – 2nd watering sewage; 3 – 3rd watering sewage

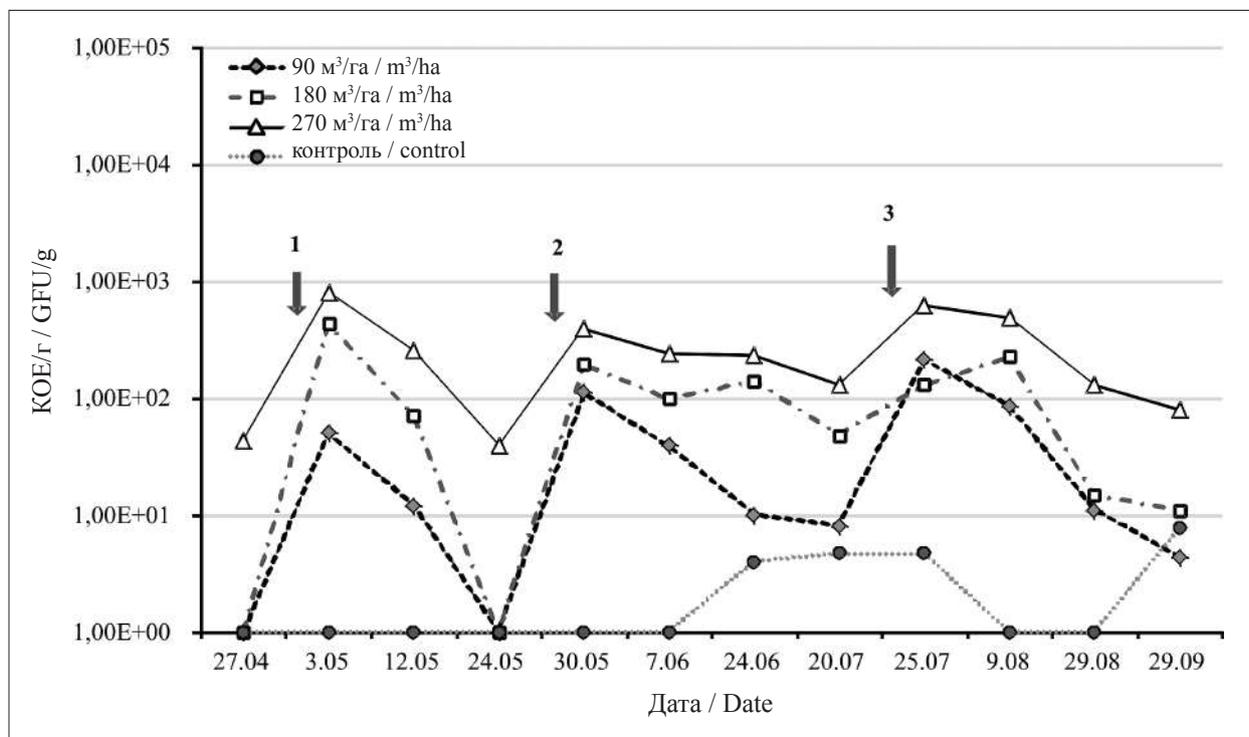


Рис. 2. Динамика *E. coli* в почвах полевого участка.
 Варианты опыта и обозначения такие же, как и на рисунке 1
Fig. 2. The dynamics of *E. coli* in the soils of the field site
 Experiment options and designations are the same as in Figure 1

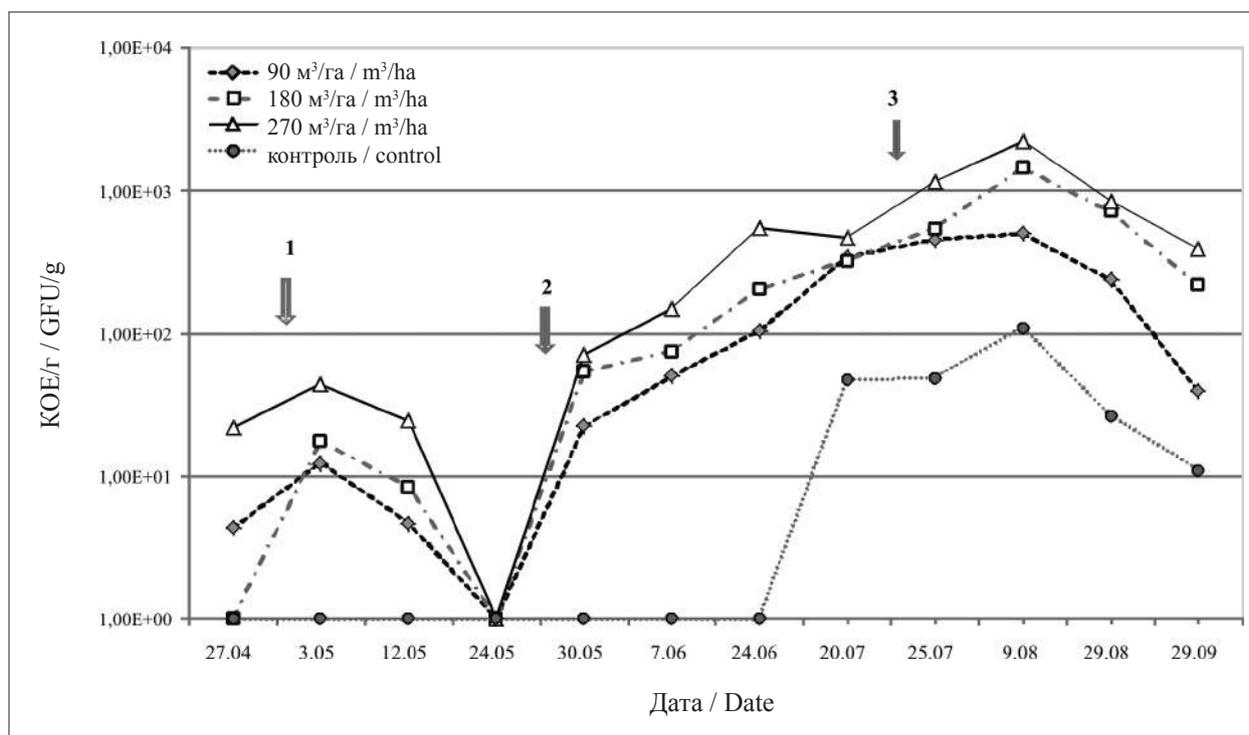


Рис. 3. Динамика энтерококков в почвах полевого участка
 Варианты опыта и обозначения такие же, как и на рисунке 1
Fig. 3. The dynamics of enterococci in the soils of the field site
 Experiment options and designations are the same as in Figure 1

Таблица / Table

Параметры уравнений линейной регрессии от времени, *D*-значения и коэффициенты отмирания БГКП, *E. coli* и энтерококков / The parameters of the linear regression equations from time to time, *D*-values and dying factors of coliform bacteria, *E. coli* and enterococci

Номер полива/ норма полива, м ³ /га Watering number/ watering rate, m ³ /ha	<i>N</i> ₀ КОЕ/г <i>N</i> ₀ CFU/g	Коэффициент отмирания <i>k</i> , день ⁻¹ Death rate <i>k</i> , day ⁻¹	<i>R</i> ²	<i>F</i> -критерий <i>F</i> -value	Критическое значение <i>F</i> -критерия* Critical <i>F</i> -value*	<i>D</i> -значения, дни <i>D</i> -values, days
БГКП / Coliform bacteria						
1 / 90	878	0,131	0,75	21,53	5,59	17,6
3 / 270	1616	0,034	0,91	97,39	4,96	68,1
3 / 90	531	0,062	0,78	34,70	4,96	37,2
<i>E. coli</i>						
1 / 270	3943	0,222	0,71	17,32	5,59	10,4
1 / 180	1986	0,253	0,93	92,79	5,59	9,1
1 / 90	60	0,129	0,79	13,57	5,59	17,9
2 / 270	446	0,029	0,43	7,61	4,96	79,6
2 / 180	193	0,033	0,35	5,28	4,96	70,4
2 / 90	91	0,049	0,65	18,69	4,96	46,7
3 / 270	832	0,049	0,71	24,08	4,96	46,6
3 / 180	138	0,039	0,48	9,24	4,96	58,4
3 / 90	124	0,053	0,61	15,47	4,96	43,5
Энтерококки / Enterococci						
1 / 270	139	0,149	0,88	50,09	5,59	15,4
1 / 180	35	0,106	0,73	18,80	5,59	21,7
1 / 90	21	0,092	0,65	13,14	5,59	25,1
3 / 270	1876	0,025	0,49	9,46	4,96	92,1
3 / 90	870	0,057	0,66	19,60	4,96	40,2

Примечание: * – на уровне значимости $p = 0,05$.

Note: * – at the significance level $p = 0.05$.

обнаруживалась в количестве 80 КОЕ/г при существенной разнице с контролем. В почвах контрольных делянок количество данного фекального индикатора не превышало 10 КОЕ/г.

В изменении численности энтерококков наблюдалась следующая закономерность: после подъёма численности в результате 1-го полива СВ наблюдался экспоненциальный спад, а второй и третий поливы СВ приводили к росту показателя. Так, через месяц после 2-го полива число энтерококков увеличивалось на порядок – при нормах 180 и 270 м³/га соответственно до $2,0 \cdot 10^2$ и $5,5 \cdot 10^2$ КОЕ/г. После 3-го полива СВ их численность значительно возрастала (до $1,44 \cdot 10^3$ и $2,21 \cdot 10^3$ КОЕ/г при поливах соответственно 180 и 270 м³/га). Наблюдалась недостаточная очистка почв от данных МО к концу вегетационного периода: при нормах полива 270, 180 и 90 м³/га их содержалось, соответственно, $3,94 \cdot 10^2$; $2,17 \cdot 10^2$; 39 КОЕ/г. Почва контрольных участков содержала энтерококки на уровне 10 КОЕ/г. Разница с контролем оказалась статистически значимой (при уровне значимости $p = 0,05$)

при нормах 180 и 270 м³/га и не значимой при 90 м³/га.

Отмирание индикаторных бактерий было описано как функция линейной регрессии от времени. Для этого концентрации МО трансформированы в виде натуральных логарифмов. На основе полученных уравнений оценены константы скорости отмирания и время 10-кратного сокращения численности МО (так называемое *D*-значение). *D*-значение или «время десятичного сокращения» – это время, необходимое для достижения гибели 90% (или 1 lg) бактерий при данном наборе условий [3, 18].

В таблице представлены уравнения регрессии, имеющие значимые параметры, и расчёты на их основе. Константы скорости отмирания МО, полученные как функция времени линейной регрессии, можно использовать в уравнении 1 для прогнозирования количества бактерий в почвах ЗПО.

В большей мере экспоненциальным падением численности исследуемых бактерий сопровождался первый полив СВ в конце

апреля, причём полученные регрессионные зависимости имели преимущественно высокий коэффициент детерминации от 0,7 до 0,9, что свидетельствует о высоком качестве модели. Наибольшая скорость отмирания отмечалась для *E. coli*: константа отмирания k находилась в диапазоне от 0,129 (полив СВ 90 м³/га) до 0,253 день⁻¹ (полив СВ 180 м³/га). В исследовании в лабораторных условиях инокуляция *E. coli* в двух типах почв сопровождалась более низкими константами отмирания от 0,09 до 0,17 день⁻¹ [19]. В сравнении с другими исследуемыми показателями данная бактерия имела наименьшее время 90%-ной элиминации: от 9,1 до 17,9 дня. Можно отметить, что при первом поливе СВ наибольшая скорость отмирания МО наблюдалась при более высокой норме поливных СВ, что связано с нарастанием конкурентных взаимоотношений МО при увеличении нормы стоков. Так, D -значение для *E. coli* при норме полива СВ 270 м³/га – 10,4 дня, а при норме 90 м³/га – 17,9 дней; для энтерококков при норме 270 м³/га – 15,4, а при норме 90 м³/га – 25,1 дня.

Второй полив СВ в конце мая зачастую сопровождался увеличением численности в почве бактерий (энтерококки, БГКП), что не соответствовало принятой модели. Только для *E. coli* были получены уравнения отмирания бактерий 1-го порядка и то с невысокой и средней степенью аппроксимации (коэффициент детерминации $R^2 = 0,35–0,65$). Скорость отмирания данного вида МО значительно снизилась в сравнении с первым поливом: константа отмирания k находилась в диапазоне от 0,029 до 0,049 день⁻¹, время 10-кратного сокращения численности увеличилось до 46,7–79,6 дней. Полученный результат свидетельствует о снижении способности почвы к самоочищению в данный период, а также о более благоприятных погодных-климатических условиях для депонирования нежелательной микробиоты, что необходимо учитывать при построении моделей.

В результате третьего полива стоками в июле после первоначального подъёма численности бактерий наблюдалось постепенное её снижение для всех исследуемых фекальных индикаторов, что связано, по всей видимости, с ухудшением температурного режима. Однако в сравнении с первым поливом СВ скорость элиминации бактерий снизилась для всех исследуемых показателей. Так, константа k при поливах СВ 90 и 270 м³/га для *E. coli* снизилась от 2,43 до 4,49 раза соответственно

(в среднем в 4,45 раза); для энтерококков от 1,6 до 5,97 раза соответственно (в среднем в 3,79 раза); для БГКП – в 2,12 раза (при поливе СВ 90 м³/га). Соответственно увеличилось и D -значение – для *E. coli* при поливах СВ 90 и 270 м³/га оно увеличилось до 43,5 и 46,6 дней соответственно; для энтерококков – до 40,2 и 92,1 дней соответственно; для БГКП – до 37,2 дней (при поливе СВ 90 м³/га).

Выводы

1. К концу вегетационного периода в почвах ЗПО в результате трёхкратного внесения сточных вод с нормами полива 180 и 270 м³/га наблюдается стойкое бактериальное загрязнение по показателям БГКП и энтерококков (гигиенический норматив превышен на 2 порядка).

2. Многократные поливы СВ в течение одного вегетационного периода приводят к нарастанию кондуктивных свойств почвы, снижению её способности к самоочищению: от первого к третьему поливу сточными водами скорость элиминации *E. coli*, энтерококков и БГКП уменьшается в среднем в 4,45; 3,79 и 2,12 раза соответственно.

3. Для адекватного описания динамики отмирания фекальных бактерий в почвах сельскохозяйственных полей орошения необходимо учитывать погодные-климатические, физические и химические свойства почвы, объём внесения стоков и др.

References

1. Tivo P.Ph., Anzhenkov A.S., Saskevich L.A., But E.A. Analysis of modern technologies to use livestock waste // Melioratsiya. 2017. No. 3. P. 54–63 (in Russian).
2. Bradford S.A., Morales V.L., Zhang W., Harvey R.W., Packman A.I., Mohanram A., Welty C. Transport and fate of microbial pathogens in agricultural settings // Critical Reviews in Environmental Science and Technology. 2013. No. 43. P. 775–893. doi: 10.1080/10643389.2012.710449
3. Soupir M.L., Mostaghimi S.J. Lou die-off of *E. coli* and enterococci in dairy cowpats // Transactions of the ASABE. 2008. V. 51. No. 6. P. 1987–1996.
4. Glinushkin A.P., Sokolov M.S., Toporova E.Yu. Phytosanitary and hygienic requirements for healthy soil. Moskva: Izdatelstvo Agrorus, 2016. 288 p. (in Russian).
5. Hutchison M.L., Walters L.D., Moore T., Thomas D.J., Avery S.M. Fate of pathogens present in livestock wastes spread onto fescue plots // Appl. Environ. Microbiol. 2005. V. 71. No. 2. P. 691–696. doi: 10.1128/AEM.71.2.691-696.2005

6. Purdy C.W., Straus D.C., Harp J.A., Mock R. Microbial pathogen survival study in a High Plains Feedyard Playa // Texas J. Sci. 2001. V. 53. No. 3. P. 247–266.
7. Duffy G. Verocytotoxicigenic *Escherichia coli* in animal faeces, manures and Slurries // J. Appl. Microbiol. 2003. V. 94. No. s1. P. 94–103. doi: 10.1046/j.1365-2672.94.s1.11.x
8. Semenov A.V., Franz E., Van Overbeek L., Termorshuizen A.J., Van Bruggen A.H. Estimating the stability of *Escherichia coli* O157: H7 survival in manure-amended soils with different management histories // Environmental microbiology. 2008. V. 10. No. 6. P. 1450–1459. doi: 10.1111/j.1462-2920.2007.01558.x
9. Wang H., Ibekwe A.M., Ma J., Wu L., Lou J., Wu Z., Liu R., Xu J., Yates S.R. A glimpse of *Escherichia coli* O157:H7 survival in soils from eastern China // Science of the Total Environment. 2014. V. 476–477. P. 49–56. doi: 10.1016/j.scitotenv.2014.01.004
10. Lang N.L., Bellett-Travers M.D., Smith S.R. Field investigations on the survival of *Escherichia coli* and presence of other enteric microorganisms in biosolids-amended agricultural soil // J. Appl. Microbiol. 2007. V. 103. No. 5. P. 1868–1882. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03489.x
11. Crane S.R., Moore J.A. Modeling enteric bacterial die-off: A review // Water Air Soil Poll. 1986. V. 27. No. 3/4. P. 411–439. doi: 10.1007/BF00649422
12. Wang L., Mankin K.R., Marchin G.L. Survival of fecal bacteria in dairy cow manure // Trans. ASAE. 2004. V. 47. No. 4. P. 1239–1246. doi: 10.13031/2013.16574
13. Chezlova O., Volchak A. Community of opportunistic bacteria of Enterobacteriaceae family in livestock sewage // Natural environment of Polesie: features and development prospects: Sbornik nauchnykh trudov. Brest: Alternativa, 2018. P. 106–108 (in Russian).
14. Instruction 4.2.10-12-9-2006. Methods of sanitary and microbiological studies of the soil: Approved by the Resolution of the Chief State Sanitary Doctor May 29. 2006. No. 67. Minsk, 2006. 32 p. (in Russian).
15. Application Instructions No. 026–0309 Microbiological diagnosis of diseases caused by enterobacteria: Approved by the Chief State Sanitary Doctor of the Republic of Belarus. Minsk, 2009. 103 p. (in Russian).
16. Valuyev V.Ye., Volchek A.A., Poyta P.S., Shvedovskiy P.V. Statistical methods in environmental management: studies. manual. Brest: BrPI, 1999, 252 p. (in Russian).
17. Shurkhno R.A., Norina O.S., Gibadullina F.S., Tagirov M.Sh. Biological activity of the rhizosphere of perennial legumes // Achievements of science and technology of agriculture. 2007. No. 3. P. 16–20 (in Russian).
18. Mazzola P., Penna T.C., M da S Martins A. Determination of decimal reduction time (D value) of chemical agents used in hospitals for disinfection purposes. BMC infectious diseases, 2003. P. 3–24. doi: 10.1186/1471-2334-3-24
19. Mubiru D.N., Coyne M.S., Grove J.H. Mortality of *Escherichia coli* O157:H7 in two soils with different physical and chemical properties // J. Environ. Qual. 2000. V. 29. No. 6. P. 1821–1825.