

## ЕКОЛОГИЯ

### АНТИМИКРОБНА АКТИВНОСТ НА СУПЕРФОСФАТИ С ОГЛЕД ПРИЛОЖЕНИЕТО ИМ ЗА ДЕКОНТАМИНАЦИЯ НА ОРГАНИЧНИ ТОРОВЕ

ТЕОДОРА П. ПОПОВА

Лесотехнически университет, Факултет по ветеринарна медицина - София

Съдържанието на патогенни микроорганизми в органичните отпадъци от животновъдството ги прави източник на контаминация на околната среда при директното им приложение за наторяване на почви. Ето защо те не могат да бъдат отлагани в природата без предварителна обработка за обезопасяването им. Освен класическото компостиране, което широко се използва навсякъде по света, е необходимо търсенето на възможности за по-бързо постигане на деконтаминация, които същевременно да са сигурни, удобни, икономични и безопасни за околната среда. От химичните средства се прилагат най-често негасена вар, NaOH, неорганични киселини, катионни полимери, бентонит, алуминиеви соли, амониеви соли, азотни и фосфатни торове, както и суперфосфати.

Големите количества отпадъци от промишленото животновъдство налагат ускорено рециклиране, осигуряващо тяхното сигурно обеззаразяване преди прилагането им за наторяване. Такива надежди се възлагат на приложението на суперфосфатни азотни съединения. Освен, че повишават съдържанието на азот и фосфор в обработените с тях торови материали, те могат да имат инхибиращо действие върху патогенните микроорганизми в животинските отпадъци. Целта на третирането е да премахне

или да намали популацията на микроорганизмите, като това е свързано с химични изменения (Sekar et al., 2010).

За преценка на ефекта на суперфосфатите в това отношение, както и за оптималното им дозиране, от съществено значение е наличието на данни за инхибиторния ефект *in vitro* и минималните потискащи концентрации за микроорганизми от различни групи. Тъй като такива данни не се откриват в достъпната литература, целта на настоящите изследвания бе определяне на антимикробното действие на суперфосфати в агар-гел дифузионния метод, както и на най-малките концентрации, които възпрепятстват размножаването на Грам-положителни и Грам-отрицателни микроорганизми.

#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

**Химични съединения.** Изпитан беше ефектът на следните съединения: ♦ Моноамониев фосфат (Амофос) на гранули от 1 до 5 mm от Агрикола - България. Съдържание на азот (N) – 12.6%. Съдържание на фосфат ( $P_2O_5$ ) – 52.4%. Влага – 1.10%. ♦ Диамониев фосфат (DAP) на гранули от 1 до 4 mm от Агрикола - България. Съдържание на азот (N) – 18,74%. Съдържание на фосфат ( $P_2O_5$ ) – 46.90%. Влага – 0.81%. Аз-

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Настоящата разработка е финансирана от ФНИ в резултат на изпълнение на научно-изследователски проект ДВУ 02-282/2010 „Екологизация на анаеробни биотехнологии чрез комбиниране на енергийни култури и отпадъчна биомаса”.

отните съединения бяха приложени в крайни концентрации на азота 200 и 600 ppm.

**Микроорганизми.** Използвани бяха 18 бактериални щама от различни видове отрицателни и положителни по Грам микроорганизми, съответно по 3 щама *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Paenibacillus alvei* и *Candida albicans*. Те бяха изолирани от животни с различни хронични инфекции, а *P. alvei* – от пчелни пити с европейски гнилец.

Използван бе класическият *агар-гел дифузионен метод* на **Bauer et al.** (1966). Химичните съединения и контролите бяха прилагани чрез накапване по 0.1 ml (1000 µg за суперфосфатите и 30 µg за антибиотика) в 9-mm ямки в агар на Mueller-Hinton с тънък агаров слой на дъното. Резултатите бяха отчитани чрез измерване на диаметрите на инхибиторните зони в милиметри, включващи и диаметъра на ямката. Съгласно тристепенната система на Bauer-Kirby инхибиторен ефект на солите бе установяван при зони > 12 mm и >17 mm за тиамфеникола.

**Минималните потискащи концентрации** (МПК) бяха определяни по метода на двукратните серийни разреждания в агар на Mueller-Hinton (Antisel - Sharlau Chemie S. A., Spain) с pH 7,2-7,4, описан от **Ericsson and Sherris** (1971) и **NCCLS M100-S9** (1999). Бактериалните суспензии бяха нанасяни в доза 10<sup>6</sup> клетки/ml. След инкубиране при 35 -37°C за 18-24 h бе определян броят на развилите се колонии. Изследваните съединения бяха прилагани в двукратно нарастващи концентрации от 64 до 2048 µg/ml агар. МПК<sub>50</sub> и МПК<sub>90</sub> бяха изчислявани математически в зависимост от броя на инхибираните колонии на агара в зоната със съответното разреждане на изследваното съединение в сравнение с колонии на средата с контролата без прибавяне на веществата. Като диапазон на потискане на растежа (D) бе определяна концентрацията без видим растеж.

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

## РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Резултатите от изследванията на антими-кробния ефект на двата фосфата по агаровия дифузионен метод, определен за 18 щама от 6 различни вида Грам-положителни и Грам-отрицателни патогенни микроорганизми, са обобщени в табл. 1.

Както се вижда от представените данни, двете съединения проявяват антими-кробно действие. То е по-добре изразено по отношение на изпитаните Грам-положителни микроорганизми. Средните стойности на диаметрите на инхибиторните зони са значителни. При много от изследваните щамове са близки до тези на контролния антибиотик, като разликите не са статистически значими ( $P > 0.05$ ). При някои видове като *P. alvei* те дори превъзхождат тези на тиамфеникола. По-висока инхибиторна активност е отчетена при диамониевия фосфат, но разликите със стойностите за моноамониевия фосфат са статистически значими само при *C. albicans* ( $P < 0.05$ ). Най-висока чувствителност към диамониевия фосфат проявяват изпитаните стафилококи, стрептококи и овални гъби. Разликите в средните диаметри на инхибиторните зони при отделните видове микроорганизми не са достоверни ( $P > 0.05$ ).

Резултатите от изследванията за определяне на минималните потискащи концентрации на моноамониев фосфат за 18 щама от 6 различни вида Грам-положителни и Грам-отрицателни патогенни микроорганизми могат да се видят на табл. 2.

Както се вижда от обобщените данни, най-ниски МПК на моноамониевия фосфат са отчетени за *Salmonella enterica*, а най-високи – за *Candida albicans*. Разликите не са статистически достоверни ( $P > 0.05$ ). Грам-положителните микроорганизми проявяват по-слаба чувствителност към този суперфосфат. Ниска е чувствителността и на *Pseudomonas aeruginosa*, който се характеризира с висока резистентност към химични въздействия.

От табл. 3 могат да се видят резултатите от изследванията, извършени за определяне на

Таблица 1. **Инхибиторен ефект на суперфосфати върху патогенни микроорганизми, установен по агар-гел дифузионния метод**

Table 1. **Inhibitory effect of superphosphates on the pathogenic microorganisms established in agar gel diffusion method**

Микроорганизми	Брой щамове	Инхибиторни зони в mm		
		Моноамониев фосфат	Диамониев фосфат	Thiamphenicol
<i>S. enterica</i>	3	13.7 ± 0.6	15.0 ± 0.0	19.7 ± 9.0
<i>P. aeruginosa</i>	3	16.3 ± 2.1	14.7 ± 1.5	22.3 ± 5.5
<i>S. aureus</i>	3	16.0 ± 2.0	25.7 ± 7.8	24.0 ± 6.0
<i>S. pyogenes</i>	3	15.7 ± 2.8	18.7 ± 5.5	29.7 ± 0.6
<i>P. alvei</i>	3	17.7 ± 5.0	17.3 ± 2.3	13.0 ± 2.0
<i>C. albicans</i>	3	15.3 ± 1.2	18.7 ± 0.7	21.2 ± 4.2
Общо:	18	15.8 ± 1.0	18.4 ± 8.9	21.7 ± 5.5

Таблица 2. **Минимални потискащи (МПК) на моноамониев фосфат за патогенни микроорганизми**

Table 2. **Minimum inhibitory concentrations of monoammonium phosphate for pathogenic microorganisms**

Видове микроорганизми	Брой щамове	МПК <sub>50</sub> (µg/ml)	МПК <sub>90</sub> (µg/ml)	D (µg/ml)
<i>Salmonella enterica</i>	3	213.3±92.4	426.7±184.7	853.3±359.6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3	373.3±244.4	746.6±488.5	1493.3±977.6
<i>Staphylococcus aureus</i>	3	320.0±277.1	640.0±554.2	1280.0±1108.5
<i>Streptococcus pyogenes</i>	3	373.3±244.4	746.6±488.8	1493.3±977.6
<i>Paenibacillus alvei</i>	3	373.3±244.4	746.6±488.8	1493.3±977.6
<i>Candida albicans</i>	3	640.0±0.0	1280.0±0.0	2560.0±0.0
Общо:	18	382.2±140.8	764.4±292.8	1528.8±563.2

минималните потискащи концентрации на диамониевия фосфат за 18 щамове от 6 различни вида патогенни микроорганизми.

Представените данни показват, че всички изследвани микробни видове проявяват значително по-висока чувствителност към диамониевия фосфат, отколкото към моноамониевия. Отново Грам-отрицателните бактерии се влияят от по-ниски концентрации в сравнение с Грам-положителните. Разликите обаче нямат статистическа значимост ( $P > 0.05$ ). Пра-

ви впечатление високата чувствителност на *Pseudomonas aeruginosa*. Това е съществено от практическа гледна точка, тъй като той е един от най-устойчивите към химични средства микроорганизми. Най-ниска чувствителност отново показва *Candida albicans* и за потискане на нейното развитие са необходими най-високи концентрации диамониев фосфат.

Резултатите от настоящите изследвания показват, че обработката на компостирани органични отпадъци със суперфосфати би

Таблица 3. Минимални потискащи (МПК) на диамониев фосфат за патогенни микроорганизми

Table 3. Minimum inhibitory concentrations of diammonium phosphate for pathogenic microorganisms

Видове микроорганизми	Брой щамове	МПК <sub>50</sub> (µg/ml)	МПК <sub>90</sub> (µg/ml)	D (µg/ml)
<i>Salmonella enterica</i>	3	213.3±92.4	426.7±184.7	853.3±359.5
<i>P. aeruginosa</i>	3	133.3±46.2	266.7±92.4	533.3±184.7
<i>S. aureus</i>	3	373.3±244.4	746.6±488.8	1493.3±977.6
<i>S. pyogenes</i>	3	160.0±0.0	320.0±0.0	640.0±0.0
<i>P. alvei</i>	3	213.3±92.4	426.7±184.7	853.3±359.5
<i>C. albicans</i>	3	533.3±184.7	1066.7±369.5	2560.0±0.0
Общо:	18	271.0±153.0	542.2±306.2	1155.5±764.5

подпомогнала тяхната деконтаминация по отношение на патогенни Грам-отрицателни (салмонели, *P. aeruginosa*) и Грам-положителни бактерии (стафилококи, стрептококи, бацили). Прибавянето на суперфосфати и особено на диамониев фосфат би намалило времето на компостиране на такива материали с оглед избягване на натрупването на големи количества органични отпадъци. Едновременно с редуцията на патогенните микроорганизми ще се повиши съдържанието на азот и фосфор в получените торове и ще се подобри наторяването на почвата след тяхното приложение. Антимикробното действие на суперфосфатите след прибавянето им в торовете не се дължи на промяна на рН, тъй като се отчита незначително повишение на стойностите. При прибавянето им в говежди тор в крайна концентрация 600 ppm рН достига 7.6, докато преди това то е 7.0.

По-високата устойчивост на *Candida albicans* към двата изследвани фосфата в сравнение с бактериите има положителен аспект, тъй като може да даде възможност за комбиниране на химическото въздействие с приложение на биологични методи. Касае се за използване на микроорганизми биодеграданти - микробни консорциуми от бактерии и гъбички, които предизвикват бърза ферментация на компостираните материали. Според **Zhang et al.** (2005) и **Sekar et al.** (2010) съчетанието

на подобна химична обработка с прибавяне на биодеградиращи микроорганизми дава по-добри резултати.

#### ИЗВОДИ

Изследваните суперфосфати проявяват инхибиторна активност спрямо и Грам-положителни и Грам-отрицателни микроорганизми. Сред изследваните микроорганизми с по-висока чувствителност се отличават Грам-положителните бактерии.

Диаметрите на зоните на подтискане на растежа са средно  $15.8 \pm 1.0$  за моноамониевия и  $18.4 \pm 8.9$  за диамониевия фосфат. Ефектът на диамониевия фосфат е малко по-добър. Средните стойности на МПК<sub>50</sub> за него са  $271.0 \pm 153.0$ , докато за моноамониевия фосфат са по-високи –  $382.2 \pm 140.8$ .

#### ЛИТЕРАТУРА

- Bauer, A. W., W. M. Kirby, J. C. Cherris, M. Truck,** 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. The Am. J. of Clin. Pathol., 45 (4): 493 – 496.
- Ericsson, H. M., J. S. Sherris,** 1971. Antibiotic sensitivity testing. Acta Path. Microb. Scand. Suppl., 217, 3 – 86.
- National Committee for Clinical Laboratory**

**Standards**, 1999: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Ninths Informational Supplement. NCCLS Document M100 – S9, Vol. 18, No 1.

**4. Sekar, S., S. Karthikeyan, P. Iyappan**, 2010. Trends in patenting and commercial utilisation

of poultry farm excreta. World's Poultry Science Journal, 66, 533-572.

**5. Zhang, Y., S. Wei, H. Wang**, 2005. Rapid microbial zymophyte agent and zymolysis process for chicken manure. CN. Patent 1605579, 13 April 2005.

## ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF SUPERPHOSPHATES WITH A VIEW OF THEIR APPLICATION FOR DECONTAMINATION OF ORGANIC FERTILIZERS

*Teodora P. Popova*

*University of Forestry, Faculty of Veterinary Medicine - Sofia*

### SUMMARY

Studies to determine the antimicrobial effect of nitric monoammonium and diammonium phosphate were performed. The minimum inhibitory concentrations (MIC) and the zones of growth inhibition in the agar diffusion method for various Gram-positive and Gram-negative organisms. Eighteen pathogenic bacterial strains belonging to the species *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Paenibacillus alvei* and *Candida albicans* were used. Sensitivity of microorganisms to both nitrogen compounds was established. It was better expressed in Gram-positive bacteria tested. Mean diameters of the zones of growth inhibition were  $15.8 \pm 1.0$  for mono- and  $18.4 \pm 8.9$  for diammonium phosphate. The results of the two methods used showed that a better antimicrobial effect manifested diammonium phosphate. Mean  $MIC_{50}$  of that compound were  $271.0 \pm 153.0$ , while  $MIC_{50}$  of monoammonium phosphate were higher –  $382.2 \pm 140.8$ .

**Key words:** *monoammonium phosphate, diammonium phosphate, minimum inhibitory concentrations*

e-mail: dr\_tpopova@abv.bg