

ЕКОЛОГИЯ

ПРОУЧВАНЕ ВЪРХУ ВЪЗМОЖНОСТИТЕ ЗА ПРИЛОЖЕНИЕ НА
ФОРМАЛИН ЗА ДЕКОНТАМИНАЦИЯ НА ГОВЕЖДИ ТОР

ТЕОДОРА П. ПОПОВА, БАЙКО Д. БАЙКОВ*

Лесотехнически университет, Факултет по ветеринарна медицина - София

*Нов български университет- София

В животинските торове се съдържат микроорганизми с различен патогенен потенциал, поради което те не са безопасни за здравето на хората и животните. Способността на патогените да оцелеят за дълъг период от време и дори след третиране да останат активни в околната среда, докато не бъдат приети от човешки или животински гостоприемник, е допълнителен повод за безпокойство. За да се сведе до минимум възможността за разпространение на причинители на инфекции чрез животинските отпадъци е необходимо приложение на методи и средства за тяхната обработка с оглед инактивиране на основните патогенни микроорганизми, присъстващи в тях. Необходими са ефективни технически решения, които могат да се използват като инструменти за свеждане до минимум на такова разпространение на патогени от селскостопанските животни в околната среда (**Bicudo and Goyal, 2003**).

С оглед избягване на натрупването на големи количества такива отпадъци, обработката им трябва да осигурява бърза и сигурна деконтаминация, но също така тя трябва да е икономична, удобна и безопасна за околната среда. Търсенето на средства и методи за тази цел е винаги актуална задача.

При традиционните варианти на компости-

ране се постигат добри резултати в тази насока, но за пълното обеззаразяване на торовете по този начин е необходимо много време (**Попова и сътр., 2009**). Друг недостатък на този метод на обработка е създаването на добри условия в компостираните без химично третиране органични материали за развъждане на вредители по посевите като охлюви, попови прасета и др. Същевременно важна страна на проблема е полученият материал за наторяване да не е токсичен за почвата или отглежданите култури.

Формалдехидът е химично съединение със значителна активност срещу бактерии, гъби и паразити (**Francis-Floyd, 1996**). При прилагане във високи концентрации бактерицидното му действие е бързо и сигурно. Тъй като в този случай той има корозивни и токсични свойства (**Неохим, 2010**), при използването му трябва да се търсят възможности за дозиране в минимални концентрации, които обаче да имат антимикробен ефект без да се отразяват негативно върху растенията и свойствата на почвата. **Haas et al. (1995)** препоръчват за инактивация на вируси при температура над 20°C приложение на 20-40 литра от 35-37% разтвор на формалин на тон тор, при което са необходими най-малко 4 дни за постигане на инактивация. Други автори като **Herniman et al. (1973)**

БЛАГОДАРНОСТИ

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

предлагат използване на значително по-висока крайна концентрация на формалина от 10%. Въпреки сигурната деконтаминация обаче така обработеният материал е токсичен за околната среда и може да се използва за торене само в много ограничени количества.

Целта на настоящите изследвания бе проследяването на преживяемостта на патогенни тест микроорганизми, внесени в прясна говежда торова постеля след обработка с формалин в различни, сравнително ниски, концентрации, с оглед оценка на възможностите за постигане на бърза и ефикасна деконтаминация и същевременно получаване на епизоотологично безопасни крайни продукти. Във връзка с тази цел друга задача на настоящата работа беше определянето на минималните потискащи и минималните бактерицидни концентрации на формалдехида за микроорганизми от различни групи.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Говежди тор. Изследвана беше прясна торова постеля от дойни крави.

Химично съединение. Изпитан бе ефектът на формалин със съдържание на 37 % формалдехид (Неохим АД), приложен в крайни концентрации 0.5 - 4%.

Микроорганизми. В изследванията бяха използвани чисти култури от три патогенни бактериални щамове: *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus epidermidis*. Те бяха изолирани от животни с хронични инфекции и бяха подбрани по демонстрираната *in vitro* полирезистентност към гентамицин и тетрациклинови антибиотици (tetracycline, doxycycline и oxytetracycline). Извършено бе допълнително култивиране на тези щамове върху хранителни среди с антибиотици от тези групи с цел изолиране и използване в изследванията на клонове, най-добре развиващи се в присъствие на високи концентрации от тези антибиотици.

За определяне на минималните потискащи и бактерицидни концентрации на формалина бяха използвани 18 бактериални щамове от различни видове отрицателни и положителни по

Грам микроорганизми, съответно по 3 щамове *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.

Хранителни среди. За изолиране и култивиране на тест бактериите бяха използвани селективни среди (Scharlau – Antisel, Bulgaria), съдържащи едновременно доксициклин в концентрация 50 µg/ml и гентамицин - 16 µg/ml. Подбрани бяха Eosin Methylene Blue agar за *P. vulgaris*, Cetrimide agar за *P. aeruginosa* и Chapman Stone agar за *S. epidermidis*. Общият брой микроорганизми в изследваните материали бе отчитан върху агар на Mueller Hinton без антибиотици. Проследени бяха също съдържанието и количествата на *Clostridium perfringens* на селективен агар (Bio Lab, Bulgaria), на *E. coli* и *Salmonella enterica* върху Eosin Methylene Blue и *Salmonella-Shigella* агар (Scharlau – Antisel, Bulgaria).

Количественото определяне на микроорганизмите бе извършвано по класическия метод в серийни, десетократно нарастващи, разреждания на изследваните материали в стерилен физиологичен разтвор. От тях бяха правени посявки върху подбраните среди със и без антибиотици, по три за всяка среда и разреждане. След инкубиране при 37°C за 24 - 72 h при аеробни и анаеробни условия (с anaerob pack with palladium catalyst – H₂ + CO₂ – Бул Био НЦЗПБ – София) бе определен средноаритметичният брой на развитите се колонии и беше изчислявано количеството на колонообразуващите единици (CFU - colony forming units) в 1 g от изходния материал.

Минималните потискащи концентрации (МПК) бяха определяни по метода на двукратните серийни разреждания в бульон на Mueller-Hinton (Scharlau – Antisel, Bulgaria) с pH 7.2-7.4, описан от **Ericsson and Sherris** (1971). За всеки от изследваните микробни щамове бе приготвяна редица от епруветки, съдържащи формалдехид в концентрации от 1 до 128 µg/ml. Във всяка от епруветките бяха прибавяни по 0.1 ml

от суспензия на съответния микробен щам с гъстота 10^6 клетки/ml. След 18-24-часово инкубиране при 35 -37°C бе определяна най-ниската концентрация на формалдехида, при която не се наблюдава растеж на микробния щам.

Минималните бактерицидни концентрации (МБК) бяха определяни по същия метод, като от епруветките с потиснат растеж от всяка редица за изследване на МБК бяха правени посеви върху агар на Mueller-Hinton (Scharlau – Antisel, Bulgaria), при което се прекратява действието на формалдехида върху микроорганизмите, нанесени на агара. След инкубиране при 35 -37°C за 18-24 h бе определяна най-малката му концентрация, при която изследваните микроорганизми са загинали и не показват растеж върху агара.

Микроскопски изследвания на микроорганизми бяха извършени под имерсия при увеличение 1000 x след оцветяване по метода на Грам на материали от култури върху различни хранителни среди.

Опитни постановки. След предварително определяне на общия брой на микроорганизмите и на тези от изследваните групи в говеждия тор, в него бяха внесени тест щамове, всеки в количество 10^5 CFU/g от общото съдържание на торовия материал. Той бе разделен на четири групи, всяка от които беше обработена с формалин в различна концентрация от 0.5 до 4%. Те бяха разпределени в стъклени съдове по 200 g, след което бяха прибавени по 100 ml разтвор на формалин и сместа бе добре хомогенизирана. Проби за определяне на количеството на микроорганизмите бяха взимани на 24-часови интервали в 10-дневен период.

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

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Резултатите от изследванията на количествените изменения на микроорганизмите в пресен говежди тор след третиране с формалин в крайни концентрации от 0.5 до 4% са представени на фиг. 1 и в табл. 1. От данните в таблица-

та се вижда също и определеното количествено съдържание в тора на *E. coli* и *C. perfringens* преди и след химичните въздействия. Не е установено съдържание на *Salmonella enterica*.

От фиг. 1 се вижда, че общият брой на микроорганизмите намалява значително още около третия ден след третирането с различни концентрации формалин. При приложение на 4% концентрация още на четвъртия ден загиват всички микроорганизми в пресния тор, а при използване на 1 и 2% това се постига до седмия ден от началото на изследването. При концентрация 0.5% в обработения тор не се откриват микроорганизми на 8-ия ден. След 48-ия час обаче остават жизнеспособни само бактерии от род *Bacillus*, което е установено в резултат на културалните и микроскопските изследвания (фиг. 2).

Представените в табл. 1 резултати показват, че обработката с формалин в приложените концентрации осигурява инактивиране на внесените патогенни тест микроорганизми в пресния тор от дойни крави още след 24 h при използване на 2 и 4%, а при по-ниските концентрации от 0.5 и 1% - в рамките на 48 h. Това се отнася и за установените в тора *Clostridium perfringens*. За сигурно инактивиране на *E. coli*, установена в пресния говежди тор, са необходими 2 денонощия при използване на 1 и 2% формалин, а при 0.5% - 3 денонощия. Най-високата изпитана концентрация от 4% осигурява загиване както на прибавените тест бактерии, така и на *E. coli* и на *C. perfringens* за максимално кратък период от 24 h.

От табл. 2 могат да се видят резултатите от изследванията, извършени за определяне на минималните потискащи и минималните бактерицидни концентрации на формалдехид, определени за 18 щамове от 6 различни вида патогенни микроорганизми.

От обобщените в таблицата данни се вижда, че както МПК, така и МБК при различните видове бактерии и при гъбите, са с близки стойности. МПК при Грам-положителните и Грам-отрицателните микроорганизми са в границите от 21.3 ± 9.2 до 32.0 ± 0.0 . Разликите не са статистически значими. Стойностите на МБК са двукратно по-високи и варират от 53.3 ± 18.5 до 64.0 ± 0.0 .

Таблица 1. Инактивиране на тест микроорганизми в пресен говежди тор след третиране с формалин в крайни концентрации от 0.5 до 4%

Table 1. Inactivation of test microorganisms in fresh cattle manure after treatment with formalin at a final concentrations of 0.5 to 4 %

Проба, дни Sample, days	<i>E. coli</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>P. vulgaris</i> тест щам test strain	<i>P. aeruginosa</i> тест щам test strain	<i>S. epidermidis</i> тест щам test strain
0	5.0.10 ⁴ ±1.6	3.8.10 ⁶ ±3.2	1.10 ⁵	1.10 ⁵	1.10 ⁵
0.5%	2.1.10 ⁴ ±0.6	1.3.10 ² ±0.5	1.8.10 ³ ±1.3	5.5.10 ³ ±2.1	7.2.10 ² ±3.5
1	1% 8.7.10 ³ ±3.1	0.5.10 ² ±0.5	2.6.10 ² ±0.8	5.1.10 ² ±1.4	0.5.10 ² ±0.2
	2% 2.0.10 ³ ±1.4	0.00	0.00	0.00	0.00
	4% 0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	0.5% 4.0.10 ² ±1.3	0.00	0.00	0.00	0.00
2	1% 0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	2% 0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	4% 0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	0.5% 0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3	1% 0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	2% 0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	4% 0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

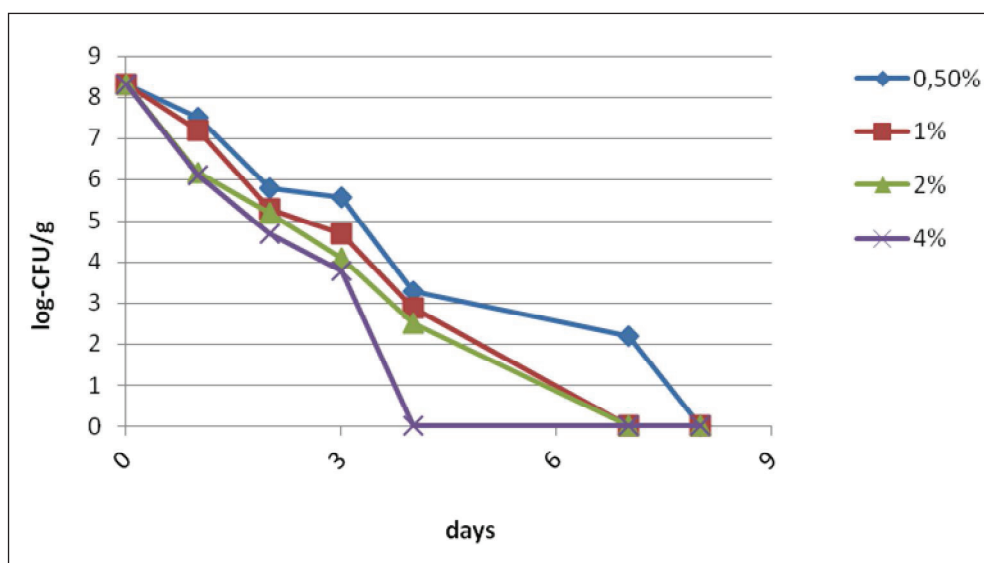
Таблица 2. Минимални подтискащи (МПК) и минимални бактерицидни концентрации (МБК) на формалдехид за патогенни микроорганизми

Table 2. Minimum inhibitory concentrations (MIC) and minimum bactericidal concentrations (MBC) of formaldehyde for pathogenic microorganisms

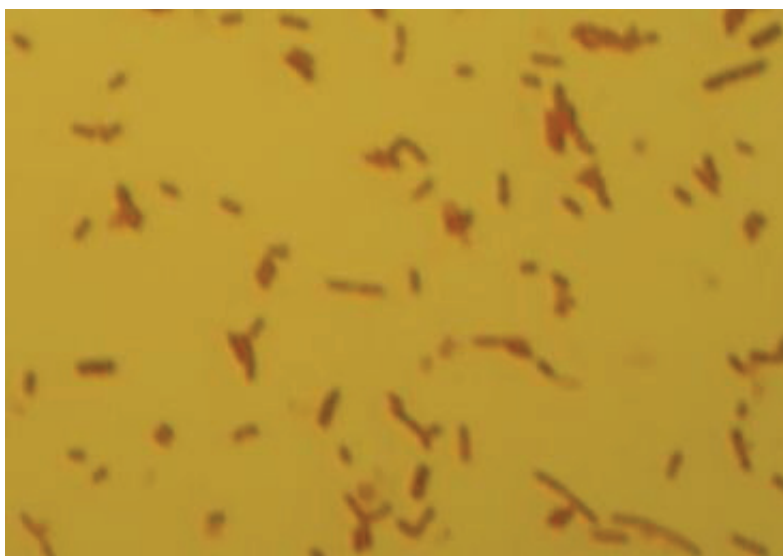
Видове микроорганизми Species of microorganisms	Брой щамове Number of strains	МПК (MIC) (µg/ ml)	МБК (MBC) (µg/ ml)
<i>Salmonella enterica</i>	3	21.3±9.2	53.3±18.5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3	21.3±9.2	53.3±18.5
<i>Staphylococcus aureus</i>	3	32.0±0.0	64.0±0.0
<i>Streptococcus pyogenes</i>	3	21.3±9.2	53.3±18.5
<i>Paenibacillus alvei</i>	3	32.0±0.0	64.0±0.0
<i>Candida albicans</i>	3	32.0±0.0	64.0±0.0
Общо/ Total:	18	26.6±5.9	58.6±5.6

Резултатите от извършените изследвания са показателни за бързата и ефикасна деконтаминация, която се постига при обработка на говежди тор с формалин. При четирите приложени концентрации се установява пълно унищожаване на микроорганизмите в пресния

говежди тор за кратко време – от 4 до 8 дни. Тези резултати, както и сходството в чувствителността към формалдехида на изследваните микроорганизми от различни групи (Грам-положителни и Грам-отрицателни бактерии и гъби), вероятно се дължат на общия механи-



Фиг. 1. Динамика на общия брой на микроорганизмите в пресен говежди тор след третиране с формалин в крайни концентрации от 0.5 до 4%.
 Fig. 1. Dynamics of the total number of microorganisms in fresh cattle manure after treatment with formalin at a final concentrations of 0.5 to 4 percent.



Фиг. 2. Бактерии от род *Bacillus*, оцветени по Грам, от култура върху агар на Мюлер-Хинтон, направена след 48-часово въздействие на 1% формалин в пресен говежди тор (x 1000).
 Fig. 2. Gram stained bacteria of the genus *Bacillus* from culture on agar, Mueller-Hinton made after 48 hours exposure to 1% formalin in fresh cattle manure (x 1000).

зъм на неговото действие върху прокариотните и еукариотните клетки. Касае се за необратимо алкилиране на техните структурни и ензимни

протеини (Попова, 2009). Сравнително ниските стойности на МПК и МБК на микроорганизмите от различни групи показват също, че

за тяхното загиване и за сигурната деконтаминация на обработваните материали биха били достатъчни многократно по-малки количества формалин от препоръчаните от някои автори като **Herniman et al.** (1973) и **Haas et al.** (1995). За много високи концентрации на формалин в органични отпадъци (5 000 ppm.) съобщава и **Dickerson** (1950), съответстващи на 500 µg/g. Според нашите резултати за постигането на МБК за повечето микроорганизми е достатъчно приложението на 1.5 литра 37% формалин на тон тор и добро хомогенизиране.

Подобни данни съобщават и **Redondo et al.** (1998). След обработка на свински тор с 0.5 формалин те са установили значителна деконтаминация в рамките на 3 денонощия. Получените от нас резултати съответстват и на тези на **Haas et al.** (1995), които установяват, че обеззаразяване на торови материали и инактивиране на вирусите в тях за период от 4 денонощия се постига при използване на 2% - 4% 35-37% разтвор на формалин при температура над 20°C. Други автори като **Herniman et al.** (1973) препоръчват значително по-висока крайна концентрация на формалина от 10%. Безспорно е, че при такава доза деконтаминацията ще бъде много бърза и сигурна, но токсичните свойства на получения продукт също ще бъдат значителни и ще ограничат използването му за наторяване. Нашите изследвания показват, че дори и при концентрация от 0.5 - 1% формалинът е в състояние да унищожи микроорганизмите в говеждия тор в рамките на 7 - 8 денонощия. Тази възможност може да се прилага за сигурно, безопасно за околната среда и сравнително бързо и икономично оползотворяване на торовите отпадъци.

Получените от нас данни свидетелстват за бързо и ефикасно обеззаразяване на говеждия тор след обработка с формалин при всички изпитани концентрации (0.5 – 4%). Патогенните микроорганизми загиват за период от 24 h - 48 h. След този срок остават жизнеспособни само спорообразуващите бацили. Те са представители на нормалната почвена микрофлора и с изключение на антраксния бацил не са епизоотологично опасни. Това дава възможност за приложение

на третираните материали за наторяване още след 2 денонощия. При необходимост от бързо унищожение и на спорообразуващите микроорганизми, може да се разчита на по-високите концентрации от 4 и 2%, при използването на които то се постига за 4 – 5 денонощия. При по-ниските концентрации от 1 и 0.5% пълното инактивиране на всички микроорганизми протича в рамките на 7 - 8 денонощия.

Използването на формалин за обеззаразяване на торова постеля дава бързи и сигурни резултати. Очевидно обаче трябва да се предпочитат по-ниските концентрации. Това е по-икономичен и по-малко токсичен за околната среда вариант. За оптимален ефект е важно пълното хомогенизиране на материала с формалдехидния разтвор.

ИЗВОДИ

В условията на проведения опит обработката с формалин на пресен тор от дойни крави осигурява инактивиране на патогенни тест микроорганизми и на *Clostridium perfringens* още след 24 h при използване на 2 и 4%, а при по-ниските концентрации от 0.5 и 1% - в рамките на 48 h.

Инактивиране на *E. coli*, установена в пресния говежди тор, се постига за 24 h при използване на 4% формалдехид, при 1 и 2 % формалин - за 2 денонощия, а при 0.5% - за 3 денонощия.

Минималните потискащи концентрации на формалдехида за изследваните Грам-положителни и Грам-отрицателни микроорганизми са в границите от 21.3±9.2 до 32.0±0.0. Стойностите на минималните бактерицидни концентрации са двукратно по-високи и варират от 53.3±18.5 до 64.0±0.0.

При използване на формалин в крайни концентрация от 0.5 и 1% се постига бърза и ефикасна деконтаминация на пресен говежди тор (24 – 48 h за бактериите, които не образуват спори и 7 – 8 денонощия за спорообразуващите). При по-високите концентрации от 2 и 4% се постигат аналогични резултати – неспорообразуващите микроорганизми загиват за 24 – 48 h, а останалите - за 4 – 5 денонощия).

ЛИТЕРАТУРА

1. **Неохим АД**, 2010. Формалин. Информационен лист за безопасност съгласно Регламент (ЕО) 1907/2006 (REACH), Приложение II Формалин, Издание: 5.0, 01/12/2010, стр. 1 - 11, http://www.neochim.bg/files/sds_formalin_bg.pdf.
2. **Попова, Т.**, 2009. Микробиология. Издат. къща при ЛТУ, София, 109.
3. **Попова, Т. П., Й. П. Петков, Б. Д. Байков, Й. Н. Наков, П. Д. Къосев**, 2009. Изпитване на възможностите за деконтаминация на торови материали посредством различни методи на компостиране. Животновъдни науки, XLVI, 6, 56 – 64.
4. **Bicudo, J. R., S. M. Goyal**, 2003. Pathogens and manure management systems: A review. *Environmental Technology*, 24, 1, 115-130 DOI:10.1080/09593330309385542.
5. **Dickerson, B. W.**, 1950. High-rate trickling operation on formaldehyde wastes. *Sewage and Industrial Wastes*, 22, 4, 536-545.
6. **Ericsson, H. M., J. S. Sherris**, 1971. Antibiotic sensitivity testing. *Acta Path. Microb. Scand. Suppl.*, 217, 3 – 86.
7. **Francis-Floyd, R.**, 1996. Use of Formalin to Control Fish Parasites. Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. <http://edis.ifas.ufl.edu/VM061>.
8. **Haas, B., R. Ahl, R. Bohm, D. Strauch**, 1995. Inactivation of viruses in liquid manure. *Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz.*, 14, 2, 435-445.
9. **Herniman K. A. J., P. M. Medhurst, J. N. Wilson, R. F. Sellers**, 1973. The action of heat, chemicals and disinfectants on swine vesicular disease virus. *The Veterinary Record*, 93, 620-624.
10. **Redondo, V. A. d. I. P., C. B. G. Martín, N. G. D Blanco., E. F. R. Ferri**, 1998. The Effect of *N*-duopropenide (a New Disinfectant with Quaternary Ammonium Iodides) and Formaldehyde on Survival of Organisms of Sanitary Interest in Pig Slurry. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 45: 481–493, DOI: 10.1111/j.1439-0450.1998.tb00819.x.

STUDY ON POSSIBILITIES FOR APPLYING OF FORMALIN FOR DECONTAMINATION OF CATTLE MANURE

*T. P. Popova, B. D. Baikov**

University of Forestry, Faculty of Veterinary Medicine - Sofia

**New Bulgarian University - Sofia*

SUMMARY

Comparative studies of the use of formaldehyde in concentrations of 0.5%, 1%, 2% and 4% for processing of fresh manure from dairy cows with a view to decontamination were performed. Test-strains of *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis*, multiresistant to gentamicin and tetracyclines, were used. TS were added in the manure each in concentration at 10⁵ CFU/g from its content and the changes in their quantities were traced. Also determination of minimum inhibitory and bactericidal concentrations of formaldehyde for 18 strains of microorganisms from different groups was performed, respectively by 3 strains of *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Paenibacillus alvei* and *Candida albicans*.

It was found that treatment with formalin ensures inactivation of pathogenic test microorganisms and of *Clostridium perfringens* in the manure even after 24 h using 2 and 4%, and in lower concentrations of 0.5 and 1% - within 48 h. Inactivation of *E. coli* was achieved within 24 h after administration of 4% formaldehyde, with 1 and 2% - for 2 days and with 0.5% - for 3 days. Minimum inhibitory concentrations of formaldehyde for the investigated Gram-positive and Gram-negative organisms ranged from

21.3 ± 9.2 to 32.0 ± 0.0 . The values of minimum bactericidal concentrations were twice as high and ranged from 53.3 ± 18.5 to 64.0 ± 0.0 .

When processing fresh cow manure with formaldehyde in final concentrations 0.5 and 1% was achieved rapid and effective decontamination for a period of 24-48 h for bacteria that do not form spores and for 7-8 days for spore-forming. At higher concentrations tested of 2 and 4% the results were similar for non spore-forming microorganisms - killing for 24-48 h, and the rest - for double shorter time (4-5 days). The use of formaldehyde in final concentrations 2 and 4% did not give better results than the smaller concentrations of 1 and 0.5%, which are recommended for use.

Key words: *cattle manure, formaldehyde, test bacteria, decontamination*
e-mail: dr_tpopova@abv.bg