

MIKROORGANIZMY WSKAŹNIKOWE W OCENIE STANU SANITARNEGO GLEBY

Maria J. Chmiel✉, Krzysztof Frączek

Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

Streszczenie. Obecność mikroorganizmów wskaźnikowych w glebie odzwierciedla nie tylko stopień skażenia środowiska glebowego, ale stanowi również informację o potencjalnym ryzyku zanieczyszczenia płodów rolnych i zagrożeniu zdrowia ludzi i zwierząt. Obecnie wybór metod badawczych i kryteriów oceny stanu sanitarnego gleby nadal stanowi istotny problem badań środowiskowych, dlatego też w tej pracy podjęto próbę przedstawienia sposobów oceny jakościowej stanu sanitarnego środowiska glebowego na podstawie wybranych wskaźników mikrobiologicznych. W pracy scharakteryzowano normy i drobnoustroje rekomendowane w ocenie sanitarnej gleby: bakterie grupy coli, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., paciorkowce kałowe, bakterie przetrwalnikujące redukujące siarczany (IV), *Clostridium perfringens*.

Słowa kluczowe: gleba, mikroorganizmy, wskaźniki sanitarne

WSTĘP

Wykorzystanie żywych organizmów w biomonitoringu jest niezwykle przydatne do oceny skażenia środowiska [Bednarek i in. 2004, Traczewska 2011]. Organizmy żywe są bowiem miarodajnym źródłem informacji o zachodzących procesach w środowisku, zarówno tych pozytywnych, jak i negatywnych. Ich wykorzystanie jest o tyle istotne, że każde środowisko ma własną specyfikę i praktycznie niemożliwe jest opisanie jego wszystkich możliwych reakcji na zanieczyszczenie. Nie bez znaczenia jest także fakt, że monitoring biologiczny jest tańszy niż inne metody [Bednarek i in. 2004, Świercz 2004, Avidano i in. 2005].

Organizmy określane mianem biologicznych wskaźników lub biowskaźników ustala się dzięki znajomości wymagań poszczególnych gatunków w stosunku do czynników

✉m.chmiel@ur.krakow.pl

środowiska oraz ich wrażliwości na różne rodzaje zanieczyszczeń wody, gleby i powietrza. Bardzo często wskaźniki biologiczne nie są organizmami najliczniej występującymi w badanym środowisku, ale przez swą obecność wskazują specyficzne właściwości i zmiany środowiska [Smyła 2002, Schloter i in. 2003, Banaszak i Wiśniewski 2005].

Warto podkreślić, że dobrymi biowskaźnikami mogą być tylko organizmy łatwe do identyfikacji, szybko i jednoznacznie reagujące na zmiany zachodzące w środowisku, oraz pozwalające ocenić stopień i kierunek zmian zachodzących w środowisku przyrodniczym [Visser i Parkinson 1992, Smyła 2002, Zmysłowska i in. 2002, Bednarek i in. 2004, Gajewska i in. 2012].

Mikroorganizmami wskaźnikowymi są najczęściej gatunki łatwe w hodowli laboratoryjnej lub inne jednostki systematyczne mikroorganizmów, charakteryzujące określone warunki środowiskowe bądź procesy przebiegające w środowisku. Obecność bądź nieobecność lub reakcja mikroorganizmów wskaźnikowych wskazuje na istnienie w danym miejscu czynnika zanieczyszczającego. W zależności od kierunku i zakresu prowadzonych badań środowiskowych można za organizmy wskaźnikowe przyjąć ogólną liczbę podstawowych grup mikroorganizmów w danym środowisku (bakterie, grzyby, promieniowce), ale również drobnoustroje czynne w wielu procesach, m.in.: mikroorganizmy nityfikacyjne, denityfikacyjne, diazotrofy i inne. Niewątpliwie należy rozróżnić mikroorganizmy wskaźnikowe, które reagują i wykrywają zmiany środowiska od tych, których sama obecność świadczy już o mikrobiologicznym zanieczyszczeniu gleb [Smyła 2002, Schloter i in. 2003, Bednarek i in. 2004, Avidano i in. 2005, Banaszak i Wiśniewski 2005, Błaszczuk 2007, Pourcher i in. 2007, Brochier i in. 2012, Gajewska i in. 2012].

MIKROBIOLOGICZNE ZANIECZYSZCZENIE ŚRODOWISKA GLEBOWEGO

Wśród elementów środowiska przyrodniczego gleba zajmuje szczególne miejsce jako ośrodek gromadzenia się zanieczyszczeń różnego typu. Aktualnie uważa się, że bez zdrowej czystej gleby nie może być zdrowego społeczeństwa. Z glebą związana jest zdrowa żywność, w dużej części zdrowa woda i powietrze, mikroklimat oraz zieleń wokół osiedli i miejsc pracy. Gleba pełni fundamentalną rolę w regulacji ilości zanieczyszczeń w ekosystemach. Może redukować zanieczyszczenia lub unieruchamiać je, a więc posłużyć do oceny środowiska w aspekcie biologicznym. Gleba może zapobiegać zanieczyszczeniom, dopóki nie zostanie przekroczona jej pojemność i zachowana aktywność biologiczna [Smyk 1985, Paul i Clark 2007].

Gleba stanowi również jeden z podstawowych rezerwuarów drobnoustrojów. Bio-różnorodność tego środowiska zależy od wielu czynników decydujących o rozwoju mikroorganizmów, takich jak: żyzność gleby, odczyn, wilgotność, struktura, temperatura, szata roślinna, zanieczyszczenie chemiczne i inne. Naturalna mikrobiota to różnorodne bakterie, grzyby i promieniowce oraz wirusy roślinne i pierwotniaki [Smyk 1985, Paul i Clark 2007, Libudzisz i in. 2007, Calver i in. 2009]. Mikrobiota gleby stanowi 0,2% ciężaru gleby, zajmując około 1,33% objętości. W zależności od typu gleby, sposobu jej użytkowania czy pory roku można zaobserwować w jednym jej gramie od 10^6 do 10^{10} jtk (jednostek tworzących kolonie) hodowalnych bakterii, 10^5 do 10^7 promieniowców,

10^4 do 10^7 grzybów [Sveshnikova i in. 2001, Uhlířová i Šantrůčková 2003, Chmiel 2013]. Jednak wiele zespołów mikroorganizmów glebowych nie jest jeszcze rozpoznanych, gdyż stanowią je w większości tzw. VBNC (ang. *viable but nonculturable*) – drobnoustroje „żywe, lecz niezdolne do wzrostu” w warunkach *in vitro*. Szacuje się, że tylko od 0,1 do 10% drobnoustrojów glebowych wzrasta na pożywkach mikrobiologicznych, pozostałe to komórki VBNC [Heim i in. 2002, Libudzisz i in. 2007].

W środowisku glebowym, oprócz mikroorganizmów naturalnie bytujących (mikroorganizmy autochtoniczne) typowych dla środowiska glebowego, mogą znajdować się również drobnoustroje napływowe (zymogenne), dla których gleba może stać się środowiskiem okresowego ich występowania. Dostając się do gleby z różnych źródeł, m.in. w wyniku nawożenia gleb czy wraz ze ściekami bytowo-gospodarczymi, same w sobie stanowią zanieczyszczenie. To właśnie w tej grupie mogą okresowo występować patogenne dla człowieka i zwierząt bakterie, zachowujące swoje właściwości chorobotwórcze przez długi czas [Czernomysy-Furowicz i Furowicz 1995, Zmysłowska 2002, Libudzisz i in. 2007, Paul i Clark 2007].

Do najważniejszych mikroorganizmów chorobotwórczych, które stwarzają zagrożenie dla środowiska glebowego, należą m.in. bakterie z rodzaju *Salmonella* wywołujące dur brzuszny, dur rzekomy i salmonellozy, bakterie z rodzaju *Shigella* wywołujące czerwonkę, bakterie z rodzaju *Campylobacter*, a także bakterie wywołujące gruźlicę, tularię i żółtaczkę bakteryjną, wirusy jelitowe – enterowirusy oraz grzyby i pierwotniaki chorobotwórcze. Ponadto zagrożenie stanowią jaja pasożytów jelitowych należących do *Ascaris* sp., *Trichuris* sp. oraz *Toxocara* sp. [Zagroda i Olańczuk-Neyman 2001, Zmysłowska i in. 2002].

Najczęściej mikroorganizmy chorobotwórcze, szczególnie wobec ludzi i zwierząt, nie odnajdują w glebie warunków korzystnych do wzrostu i rozwoju i podlegają stopniowej eliminacji. Do głównych czynników wpływających na długość czasu przeżycia bakterii zaliczamy: rodzaj bakterii, temperaturę, wilgotność, pH, zawartość substancji organicznych w glebie oraz obecność drobnoustrojów antagonistycznych i drapieżców. Czas przetrwania bakterii chorobotwórczych w glebie (od momentu jej kontaminacji) zmienia się w granicach od kilku godzin do kilku miesięcy, przy czym obniżenie ich do wartości niezagrażających zdrowiu następuje w ciągu 2–3 miesięcy. Bakterie z rodzaju *Salmonella* zdolne są przetrwać w glebie do 3 miesięcy, a z rodzaju *Shigella* utrzymują się przy życiu od kilku do kilkunastu dni. Należy jednak podkreślić, że niektóre bakterie mogą bytować w glebie kilka, kilkanaście a nawet kilkadziesiąt lat, np. *Bacillus anthracis* – laseczka wąglika, *Clostridium tetani* – laseczka tężca czy *C. botulinum* – laseczka jadu kiełbasianego [Zagroda i Olańczuk-Neyman 2001, Zmysłowska 2002].

Gleba zanieczyszczona tymi mikroorganizmami stanowi groźne źródło zakażenia dla ludzi i zwierząt, może również przyczyniać się do zanieczyszczenia roślin i produktów rolnych. Typowymi drogami narażenia człowieka bezpośrednio na zanieczyszczenia z gleby są:

- kontakt poprzez skórę (kontakt z glebą),
- droga wziewna (dostawanie się kurzu),
- droga pokarmowa (spożywanie roślin rosnących na i w skażonej glebie) [Czernomysy-Furowicz i Furowicz 1995, Suchy 1998, Błaszczuk 2007, Gajewska i in. 2012, PN-ISO 15800].

Omawiając występowanie bakterii patogennych w glebie, należy pamiętać, iż mimo że ich główne miejsce bytowania stanowią przede wszystkim różne tkanki zwierząt i ludzi (bakterie mezofilne), to wywodzą się one od drobnoustrojów „zamieszkujących” środowisko glebowe i wodne i stopniowo adaptowały się do wzrostu w organizmach ludzkich i zwierzęcych [Czernomysy-Furowicz i Furowicz 1995].

MIKROBIOLOGICZNE WSKAŹNIKI STANU SANITARNEGO GLEBY

Powszechnie przyjęte kryteria i zalecenia sanitarne dla gleb mają na celu eliminację lub co najmniej redukcję potencjalnych zagrożeń do bezpiecznego poziomu dla zdrowia ludzi i zwierząt. Jest to konieczne, biorąc pod uwagę ścisłą zależność pomiędzy mikrobiotą gleby a paszy oraz transmisję czynników patogennych wzdłuż łańcucha żywnościowego [Stoczyńska-Sikorska i in. 1995, Kukier, i in. 2016, PN-Z-19000-1].

Dokonując oceny jakości sanitarno-higienicznej gleby, zrozumiałym jest, że jej badanie w kierunku wykrywania wszystkich organizmów chorobotwórczych i potencjalnie chorobotwórczych, które mogłyby przedostać się do gleby i w niej występować, jest niemożliwe, chociażby ze względu na kosztochłonność i czasochłonność analiz. Drobnoustroje chorobotwórcze nie występują też stale w środowisku glebowym. Istotnym elementem prowadzonych w tym zakresie badań jest więc ocena ich jakości sanitarnej na podstawie określenia poziomu odpowiednich wskaźników mikrobiologicznych (przede wszystkim wskaźniki bakteriologiczne), których obecność w glebie stanowi skażenie mikrobiologiczne [Suchy 1998, Gajewska i in. 2012, PrPN-Z-19000-2]. Ocena sanitarna gleby koncentruje się więc przede wszystkim na wykrywaniu bakterii uznawanych za wskaźniki kałowego zanieczyszczenia gleby, stanowiących charakterystyczną biotę przewodu pokarmowego człowieka oraz zwierząt. Ich obecność w glebie wskazuje na skażenie gleby treścią przewodu pokarmowego ludzi lub zwierząt, a tym samym na duże prawdopodobieństwo wystąpienia wtedy bakterii chorobotwórczych przewodu pokarmowego [Suchy 1998, Smyła 2002, Zmysłowska 2002, Gajewska i in. 2012].

Aktualne normatywne wytyczne obowiązujące w Polsce zalecają badania mikrobiologiczne gleby pod względem obecności pałeczek *Salmonella* [PN-Z-19000-1:2001] oraz badania parazytologiczne dotyczące obecności jaj pasożytów jelitowych *Ascaris lumbricoides* i *Trichuris trichiura* [PN-Z-19000-4]. W piśmiennictwie przedmiotu są także propozycje badań mikrobiologicznych dotyczących oznaczeń obecności w glebie typowych przedstawicieli mikrobioty przewodu pokarmowego ludzi i zwierząt, tj. bakterii grupy coli i coli typu fekalnego [PrPN-Z-19000-2], *E. coli*, *C. perfringens* [PrPN-Z-19000-3], a w przypadku bliskich źródeł zanieczyszczeń, jak składowiska odpadów, oczyszczalnie ścieków czy gospodarstwa hodowlane, także innych drobnoustrojów [Stoczyńska-Sikorska i in. 1995, Topp i in. 2003, Voidarou i in. 2011, Brochier i in. 2012].

W badaniach rutynowych wskaźnikami sanitarnymi pozwalającymi na określenie stanu sanitarnego gleby są: obecność jednostek tworzących kolonie bakterii z rodzaju *Salmonella*, miano i najbardziej prawdopodobna liczba (NPL) bakterii z grupy coli oraz redukujących siarczany (IV) bakterii przetrwalnikujących *C. perfringens*, a także stwierdzenie obecności i ocena stopienia żywotności jaj pasożytów jelitowych *A. lumbricoides*

i *T. trichiura*. Wskaźniki te pozwalają ustalić nie tylko stan sanitarno-higieniczny gleby oraz stopień jej zanieczyszczenia, ale także określić pochodzenie zanieczyszczeń i przybliżony czas, w jakim gleba została skażona [Suchy 1998, PN-Z-19000-1:2001, PrPN-Z-19000-2,3, PN-Z-19000-4:2001].

CHARAKTERYSTYKA WYBRANYCH MIKROORGANIZMÓW WSKAŹNIKOWYCH

Z dostępnych w piśmiennictwie przedmiotu danych wyraźnie wynika, że obecnie wymagania sanitarne dla gleb uwzględniają pasożyty jelitowe, pałeczki *Salmonella* spp. oraz limitują inne zanieczyszczenia kałowe. Kierując się powyższymi kryteriami, przyjęto, że jako wskaźniki stanu higienicznego i sanitarnego gleby mogą służyć mikroorganizmy pochodzenia fekalnego (bakterie grupy coli, *E. coli*, paciorkowce kałowe), świadczące o zanieczyszczeniu środowiska naturalnego odchodami ludzi i zwierząt, a także bakterie przetrwalnikujące redukujące siarczany (IV) *C. perfringens* [Stroczyńska-Sikorska i in. 1995, Suchy 1998, Zmysłowska i in. 2002, Gajewska i in. 2012, PN-Z-19000-1].

Do bakterii grupy coli zaliczane są przede wszystkim szczepy *E. coli* oraz należące do rodziny Enterobacteriaceae rodzaje: *Citrobacter*, *Klebsiella* i *Enterobacter*. Pałeczki z tej rodziny stanowią dużą grupę blisko spokrewnionych bakterii najczęściej wykorzystywanych jako wskaźniki złego stanu higienicznego nie tylko w ocenie środowiska. Większość bakterii z rodziny Enterobacteriaceae to patogeny oportunistyczne, czyli warunkowo chorobotwórcze, zasiedlające głównie jelita ludzi i zwierząt. Są to Gram-ujemne pałeczki, nietworzące przetrwalników, zdolne do wzrostu w warunkach tlenowych i względnie beztlenowych na zwykłych podłożach mikrobiologicznych w szerokim zakresie temperatury i odczynu, toteż doskonale nadają się one do roli wskaźników sanitarnych [Smyła 2002, Stevens i in. 2003, Jarzab i in. 2011].

Obecność bakterii grupy coli lub grupy coli typu fekalnego (w normach ISO zastąpiono określeniem – bakterie grupy coli termotolerancyjne) jest podstawowym parametrem jakościowym w ocenie wody [Grisey i in. 2010], ponadto grupa ta coraz częściej wykorzystywana jest również jako wskaźnik stanu środowiska glebowego. Ich obecność w glebie świadczy o stosunkowo świeżym zanieczyszczeniu gleby, odchodami, ściekami lub gnijącym materiałem roślinnym. Niemniej jednak tylko obecność *E. coli* bezpośrednio wskazuje świeże zanieczyszczenie fekalne [Tyski i Rogulska 1999, Topp i in. 2003, Frączek 2010, Brochier i in. 2012].

Pałeczka okrężnicy (*E. coli*) jest symbiontem jelita grubego ludzi i zwierząt stałocieplnych. Ich fizjologiczna rola polega na udziale w rozkładzie resztek pokarmowych i syntezie witamin z grupy B, K i C oraz antagonistycznym wpływie na inne, obce pod względem ekologicznym drobnoustroje. Główną drogą transmisji *E. coli* do środowiska są odchody ludzi i zwierząt. Liczba tych bakterii w jednym gramie kału ludzkiego sięga 10^9 komórek. Jest ona najlepiej poznanym i najbardziej rozpowszechnionym przedstawicielem rodziny Enterobacteriaceae, a także chyba najpowszechniej dotychczas stosowanym wskaźnikiem w ocenie stopnia zanieczyszczenia fekalnego środowiska (wody, gleby) i żywności. Pochodzenie i cyrkulacja *E. coli* w środowisku ma duże znaczenie,

szczególnie w przypadku szczepów patogennych zagrażających zdrowiu. Warunkami przeżycia *E. coli* w środowisku są zarówno czynniki abiotyczne (dostępność składników odżywczych, temperatura, pH, wilgotność), jak i czynniki biotyczne, do których zalicza się głównie obecność innych mikroorganizmów [Suchy 1998, Zagroda i Olańczuk-Neyman 2001, Liang i in. 2011, Van Elsas i in. 2011]. Dostępne dane literaturowe bazujące na szczegółowych analizach określają zdolność *E. coli* do przeżycia w środowisku naturalnym na około 30–80 dni, przy czym podobnie jak w przypadku paciorkowców kałowych w sprzyjających warunkach (termicznych i pokarmowych) czas ten może znacząco się wydłużyć, a w skrajnych przypadkach (gleby tropikalne) może dochodzić do ponownego namnażania się bakterii i zafałszowania uzyskanych wyników [Topp i in. 2003, Whitman i in. 2003, Pourcher i in. 2007, Brochier i in. 2012, Chmiel 2013].

Innym wskaźnikiem zanieczyszczenia fekalnego środowiska są paciorkowce kałowe (enterokoki lub enterokoki jelitowe). Terminem tym określa się liczne gatunki Gram-dodatnich ziarniaków zaliczanych do rodzajów *Enterococcus* oraz *Streptococcus*. Mikroorganizmy te są powszechnie akceptowane jako użyteczne wskaźniki zanieczyszczenia fekalnego środowiska, ponieważ mogą informować o źródle i charakterze fekalnego skażenia środowiska w przypadku, gdy ich liczba znacznie przekracza liczbę bakterii grupy coli. Pozwala to na wyodrębnienie zanieczyszczeń fekalnych spowodowanych przez zwierzęta. Enterokoki stanowią naturalny składnik flory jelitowej ludzi i zwierząt stałocieplnych i występują powszechnie w ich odchodach. Jednak nie są w stanie rozmnażać się intensywnie poza tymi organizmami, a ich przeżywalność w wodzie czy glebie jest zbliżona do przeżywalności wielu bakterii chorobotwórczych [Pinto i in. 1999, Borrego i in. 2002, Smyła 2002, Lleò i in. 2005, Grisey i in. 2010]. Poszczególne gatunki enterokoków mogą charakteryzować się różnym czasem aktywności w środowisku: w zależności od panujących w nim warunków mogą przeżyć od kilku do około 60–70 dni, chociaż liczba komórek zdolnych do ponownego wzrostu w korzystnych warunkach *in vitro* znacząco zmniejsza się już po kilkunastu dniach [Heim i in. 2002, Lleò i in. 2005, Pourcher i in. 2007, Brochier i in. 2012]. Jednak w wodach ciepłych i silnie zanieczyszczonych materią organiczną oraz glebach tropikalnych rola enterokoków jako dobrych indykatorów bywa kwestionowana, gdyż czas ich przeżywalności znacznie się wydłuża, a sporadycznie, w sprzyjających warunkach, obserwowany jest nawet wzrost ich populacji, co może prowadzić do mylnej interpretacji wyników badań [Fujioka 1997, Whitman i in. 2003].

Następnym z bakteriologicznych wskaźników zanieczyszczenia fekalnego środowiska są bakterie beztlenowe z rodzaju *Clostridium* redukujące siarczany (IV) – głównie *C. perfringens*. Są one zdolne do wytwarzania spor umożliwiających im przetrwanie niekorzystnych warunków środowiskowych. Cechuje je długa przeżywalność w środowisku (woda, gleba, ścieki, osady rzeczne, gnijące resztki roślinne i zwierzęce), gdzie bytują jako organizmy saprofityczne. Nieliczne są również klasyfikowane jako patogeny człowieka i zwierząt. Stwierdzenie ich obecności wskazuje na odległe w czasie zanieczyszczenie fekalne środowiska. Są one stałym składnikiem mikrobioty przewodu pokarmowego ludzi i zwierząt stałocieplnych, przy czym liczba komórek *Clostridium* wydalanych z odchodami jest znacznie mniejsza od liczby paciorkowców kałowych czy *E. coli* [Suchy 1998, Tyski i Rogulska 1999, Ryan i in. 2010]. Wycieki z infrastruktury kanalizacyjnej i spływy powierzchniowe zawierające zanieczyszczenia z gleb oraz odchody

zwierząt hodowlanych i dzikich mogą być przyczyną przedostawania się tych bakterii do wód [Smyła 2002, Boehm i in. 2009, Viau i in. 2011]. Ze względu na długoletnią przeżywalność pałeczek *C. perfringens* w środowisku naturalnym i zagrożenie zdrowotne, jakie stwarza ich obecność w glebie i wodzie, często sugerowane jest wykorzystanie tych bakterii jako alternatywnych indyktorów do oceny czystości mikrobiologicznej środowiska naturalnego [Stroczyńska-Sikorska i in. 1995, Zmysłowska 2002, Fung i in. 2007, Viau i in. 2011].

Pałeczki *Salmonella* to bakterie jelitowe, które są obligatoryjnymi patogenami. Bakterie te są jednym ze wskaźników stanu sanitarnego gleby, ponieważ ich obecność może stanowić skażenie biologiczne zagrażające zdrowiu ludzi i zwierząt. Stanowią czynnik etiologiczny ponad połowy zatruc pokarmowych występujących u ludzi. Materiałem zakaźnym są głównie odchody, ścieki lub zakażona żywność pochodzenia zwierzęcego. W literaturze przedmiotu znajdują się bardzo różne dane dotyczące przeżywalności pałeczek *Salmonella* w środowisku naturalnym: od kilku do nawet kilkuset dni. Przeżywalność *Salmonella* w glebie i wodzie zależy od różnych czynników biotycznych i abiotycznych, jak również od początkowej liczby wprowadzonych pałeczek [Abirosh i Hatha 2005, Jacobsen i Bech 2012]. Najczęściej przeżywalność *Salmonella* określa się na 3–8 tygodni, jednak udowodniono również jej aktywność w glebie nawet po 300 dniach od zanieczyszczenia [Natvig i in. 2002, Islam i in. 2004, Brochier i in. 2012, Jacobsen i Bech 2012]. Ubogie w składniki pokarmowe środowisko wodne nie sprzyja długotrwałemu bytowaniu w nim pałeczek *Salmonella*. W zależności od różnych czynników środowiskowych żywotność tych bakterii jest określana na kilka [Abirosh i Hatha 2005], kilkadziesiąt bądź 60–130 dni [Ramalho i in. 2001].

Coraz częściej postuluje się również wprowadzenie alternatywnych wskaźników sanitarnych, których obecność wskazywałaby wyraźne źródło skażenia. W badaniach epidemiologicznych gleby i wody jako wskaźniki sanitarne znalazły na przykład zastosowanie także wirusy bakteryjne – bakteriofagi swoiste dla *E. coli*. Pozwalają one na wykazanie ścisłej zależności między liczbą wykrywanych bakteriofagów a liczbą obecnych komórek *E. coli* [Suchy 1998, Zmysłowska 2002].

WYMAGANIA HIGIENICZNE W OCENIE GLEBY

W piśmiennictwie przedmiotu zwraca się uwagę, że obecnie w Polsce nadal brakuje ustalonego ustawowego zakresu badań i obowiązujących normatywów niezbędnych do oceny zanieczyszczenia mikrobiologicznego gleby, a także ustalonych metod badawczych. Przy ocenie stanu sanitarnego gleb możemy jedynie bazować na Polskich Normach, które należą do zbioru normy arkuszowej pod wspólnym tytułem: „Jakość gleby – Ocena stanu sanitarnego gleby”. Jest ona podzielona na cztery arkusze:

- Arkusz 1 – Wykrywanie bakterii z rodzaju *Salmonella*,
- Arkusz 2 – Wykrywanie i oznaczanie ilościowe bakterii grupy coli,
- Arkusz 3 – Wykrywanie i oznaczanie ilościowe bakterii przetrwalnikujących *Clostridium perfringens*,
- Arkusz 4 – Wykrywanie jaj pasożytów jelitowych *Ascaris lumbricoides* i *Trichuris trichiura*.

Niestety przygotowane arkusze 2 i 3 tej normy i zawarte w nich wytyczne ciągle nie są obowiązujące.

W pierwszym arkuszu normy [PN-Z-19000-1:2001] podano metodę wykrywania bakterii z rodzaju *Salmonella* w glebie. W przypadku gdy stwierdzi się ich występowanie w glebie, to zaleca się wykonanie całościowych badań dotyczących stanu sanitarnego gleby, tj. wykrywanie i oznaczanie ilościowe bakterii grupy coli wg PrPN-Z-19000-2, wykrywanie i oznaczanie ilościowe bakterii przetrwalnikujących *C. perfringens* wg PrPN-Z-19000-3 oraz wykrywanie jaj pasożytów jelitowych *A. lumbricoides* i *T. trichiura* wg PN-Z-19000-4:2001. Mogą one być stosowane do badania wszystkich rodzajów gleb.

Na podstawie wyżej wymienionych wskaźników bakteriologicznych oraz parazytologicznych glebę ocenia się według kryteriów podanych w tabeli 1.

Tabela 1. Kryteria oceny stanu sanitarnego gleby

Table 1. Soil sanitary conditions benchmark

Wskaźnik stanu sanitarnego Sanitary condition indicator	Gleba czysta Clean soil	Gleba zanieczyszczona Contaminated soil
Bakterie z rodzaju <i>Salmonella</i>	nie wyizolowano	wyizolowano
Miano coli	do 0,01	>0,01
Miano <i>C. perfringens</i>	do 0,01	>0,001
Inwazyjne jaja <i>A. lumbricoides</i> <i>T. trichiura</i>	do 10 szt.·kg ⁻¹	>10 szt.·kg ⁻¹

Warto jednak podkreślić, że ocenę sanitarną gleby należy przeprowadzić, stosując jednocześnie wszystkie wskaźniki mikrobiologiczne i parazytologiczne.

PODSUMOWANIE

Chociaż coraz częściej w ocenie środowiska naturalnego rutynowo wykorzystuje się bioindykatory, wybór metod badawczych i kryteriów oceny stanu sanitarnego gleby nadal stanowi istotny problem badań środowiskowych. Ze względu na brak powszechnie obowiązujących wartości normatywnych czy referencyjnych, dobór odpowiednich wskaźników do przeprowadzenia obiektywnej oceny stanu sanitarnego gleb zależy często od subiektywnej decyzji badacza. Aktualnie w interpretacji otrzymanych wyników możemy jedynie bazować na zbiorze należącym do normy arkuszowej „Jakość gleby – Ocena stanu sanitarnego gleby” i propozycjach w nim zawartych. Jednakże podkreślić należy, że przygotowane arkusze norm nadal są na etapie dyskusji, co poniekąd uniemożliwia zapewnienie bezpieczeństwa osobom użytkującym gleby uprawne.

LITERATURA

- Abirosh Ch., Hatha, M.A.A., 2005. Relative survival of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* in a tropical estuary. *Water Res.* 39 (7), 1397–1403.
- Avidano L., Gamalero E., Cossa G.P., Carraro E., 2005. Characterization of soil health in an Italian polluted site by using microorganisms as bioindicators. *Appl. Soil Ecol.* 30, 21–33.
- Banaszak J., Wiśniewski H., 2005. Podstawy ekologii. Wyd. Adam Marszałek, Toruń, 587.
- Bednarek R., Dziadowiec H., Pokojska U., Pruszczyk Z., 2004. Badania ekologiczno-gleboznawcze. Wyd. Nauk. PWN. Warszawa, 344.
- Błaszczczyk M.K., 2007. Mikroorganizmy w ochronie środowiska. Wyd. PWN. Warszawa, 195.
- Boehm A., Ashbolt N.J., Colford J.M., Dunbar L.E., Fleming L.E., Gold M., Hansel J., Hunter P.R., Ichida A.M., McGee C., Soller J.A., Weisberg S.B., 2009. A sea change ahead for recreational water quality criteria. *J. Water Health* 7 (1), 9–20.
- Borrego J.J., Castro D., Figueras M.J., 2002. Fecal streptococci/enterococci in aquatic environments. W: G. Bitton (red.). *The encyclopedia of environmental microbiology*. John Wiley & Sons, New York, 1264–1278.
- Brochier V., Gourlan P., Kallassy M., Poitrenaud M., Houot S., 2012. Occurrence of pathogens in soils and plants in a long-term field study regularly amended with different composts and manure. *Agr. Ecosyst. Environ.* 160, 91–98.
- Calver M., Lymbery A., McComb J., Bamford M., 2009. *Environmental biology*. Cambridge University Press, Cambridge, 671.
- Chmiel M., 2013. Charakterystyka mikrobiologiczna i ocena sanitarna środowiska naturalnego Ojcowskiego Parku Narodowego ze szczególnym uwzględnieniem antropopresji. *Zesz. Nauk. UR Kraków* 505, Rozprawy 382.
- Czernomysz-Furowicz D., Furowicz A.J., 1995. Występowanie bakterii w glebie ze specjalnym uwzględnieniem drobnoustrojów chorobotwórczych. *Aspekty epidemiologiczne i epizootiologiczne*. *Ekologia i Technika* 3, 18–22.
- Frączek K., 2010. Sezonowe zmiany wskaźników stanu sanitarnego gleb na terenie oraz w rejonie składowiska odpadów komunalnych aglomeracji krakowskiej. *Woda Środ. Obsz. Wiej.* 10, 2 (30), 49–60.
- Fujioka R.S., 1997. Indicators of marine recreational water quality. W: C.J. Hurst, G.R. Knudsen, M.J. McInerney, L.D. Stetzenbach, M.V. Walter (red.). *Manual of environmental microbiology*. ASM Press, Washington DC, 176–183.
- Fung D.Y.C., Fujioka R.S., Vijayavel K., Sato D., Bishop D., 2007. Evaluation of Fung double tube test for *Clostridium perfringens* and Easyphage test for F-specific RNA coliphages as rapid screening tests for fecal contamination in recreational waters of Hawaii. *J. Rapid Meth. Aut. Mic.* 15 (3), 217–229.
- Gajewska J., Wycech M., Pladys W., Sysa P., 2012. Mikrobiologiczne wskaźniki skażenia sanitarnego gleby w okolicy przeciekającego zbiornika bezodpływowego na nieczystości ciekłe. *Zesz. Nauk. UZ, Inżynieria Środowiska* 146 (26), 81–89.
- Grisey E., Belle E., Dat J., Muddry J., Aleya L., 2010. Survival of pathogenic and indicator organisms in groundwater and landfill leachate through coupling bacterial enumeration with tracer tests. *Desalination* 261 (1–2), 162–168.
- Heim S., Lleo M.M., Bonato B., Guzman C.A., Canepari P., 2002. The viable but nonculturable state and starvation are different stress responses of *Enterococcus faecalis*, as determined by proteome analysis. *J. Bacteriol.* 184, 6739–6745.
- Islam M., Morgan J., Doyle M.P., Phatak S.C., Millner P., Jiang X.P., 2004. Fate of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium on carrots and radishes grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 2497–2502.

- Jacobsen C.S., Bech T.B., 2012. Soil survival of *Salmonella* and transfer to freshwater and fresh produce. *Food Res. Int.* 45 (2), 557–566.
- Jarząb A., Górską-Fraćzek S., Rybka J., Witkowska D., 2011. Zakażenia pałeczkami jelitowymi – diagnostyka, oporność na antybiotyki i profilaktyka. *Post. Hig. Med. Dośw.* 65, 55–72.
- Kukier E., Kozieł N., Goldsztejn M., Kwiatek K., 2016. Aktualne wymagania sanitarno-weterynaryjne dla nawozów organicznych i polepszaczy gleby w Polsce. *Życie Weterynaryjne* 91 (2), 125–127.
- Liang Z., He Z., Powell C.A., Stoffella P.J., 2011. Survival of *Escherichia coli* in soil with modified microbial community composition. *Soil Biol. Biochem.* 43 (7) 1591–1599.
- Libudzisz Z., Kowal K., Żakowska Z., 2007. *Mikrobiologia techniczna. Mikroorganizmy i środowiska ich występowania.* Wyd. PWN, Warszawa, 353.
- Lleò M.M., Bonato B., Benedetti D., Canepari P., 2005. Survival of enterococcal species in aquatic environments. *FEMS Microbiol. Ecol.* 54 (2), 189–196.
- Natvig E.E., Ingham S.T., Ingham B.H., Cooperbrand L.R., Roper T.R., 2002. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Escherichia coli* contamination of root and leaf vegetables grown in soils with incorporated bovine manure. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 2737–2744.
- Paul E.A., Clark F.E., 2007. *Soil microbiology and biochemistry.* 3rd edition, Academic Press San Diego, 552.
- Pinto B., Pienotti R., Canale G., Reali D., 1999. Characterization of faecal streptococci as indicators of faecal pollution and distribution in the environment. *Lett. Appl. Microbiol.* 29, 258–263.
- PN-Z-19000-1. Jakość gleby – Ocena stanu sanitarnego gleby – Wykrywanie bakterii z rodzaju *Salmonella*.
- PN-ISO 15800. Jakość gleby – Charakteryzowanie gleby pod kątem narażenia człowieka.
- PN-Z-19000-4:2001. Jakość gleby – Ocena stanu sanitarnego gleby – Wykrywanie jaj pasożytów jelitowych *Ascaris lumbricoides* i *Trichuris trichiura*.
- Pourcher A.M., Picard-Bonnaud F., Ferré V., Gosinska A., Stan V., Moguedet G., 2007. Survival of faecal indicators and enteroviruses in soil after land-spreading of municipal sewage sludge. *Appl. Soil Ecol.* 35 (3), 473–479.
- PrPN-Z-19000-2. Jakość gleby – Ocena stanu sanitarnego gleby – Wykrywanie obecności i oznaczanie ilościowe bakterii z grupy coli.
- PrPN-Z-19000-3. Jakość gleby – Ocena stanu sanitarnego gleby – Wykrywanie obecności i oznaczanie ilościowe bakterii przetrwalnikujących *Clostridium perfringens*.
- Ramalho R., Afonso A., Cunha J., Teixeira P., Gibbs P.A., 2001. Survival characteristics of pathogens inoculated into bottled mineral water. *Food Control* 12 (5), 311–316.
- Ryan K.J., Ray C.G., Nafees A., Drew W.L., Plorde J.J., 2010. *Medical Microbiology.* McGraw Hill, 1040.
- Schlöter M., Dilly O., Muncha J.C., 2003. Indicators for evaluating soil quality. *Agricul. Ecosyst. Environ.* 98 (1–3), 255–262.
- Smyk B., 1985. Mikroorganizmy a stabilność ekosystemów polowych. *Zesz. Probl. Nauk Roln.* 306, 127–140.
- Smyła A., 2002. *Analiza sanitarna wody.* Wyd. WSP, Częstochowa.
- Stevens M., Ashbolt N., Cunliffe D., 2003. Review of coliforms, as microbial indicators of drinking water quality. National Health and Medical Research Council, Australian Government, http://www.nhmrc.gov.au/_files_nhmrc/publications/attachments/eh32.pdf.
- Stroczyńska-Sikorska M., Kłapeć T., Cholewa A., 1995. Wytyczne metodyczne (mikrobiologiczno-parazytologiczne) do oceny sanitarnej gleby. Wyd. Instytut Medycyny Wsi w Lublinie, Lublin.

- Suchy M., 1998. Mikrobiologiczne metody w monitoringu środowiska przyrodniczego. Wyd. PIOS, Biblioteka Monitoringu Środowiska, Rzeszów.
- Sveshnikova A.A., Polyanskaya L.M., Lukin S.M., 2001. The effect of tillage and mesorelief on the structure of soil microbial cenoses. *Microbiology* 70, 484–491.
- Świercz A., 2004. Rola biowskaźników w monitoringu zanieczyszczeń środowiska i rekultywacji terenów przemysłowych. Red. M. Strzyż. Perspektywy rozwoju regionu w świetle badań krajobrazowych. *Problemy Ekologii Krajobrazu PAEK*, Kielce, 235–241.
- Topp E., Welsh M., Tien Y-C., Dang A., Lazarovits G., Conn K., Zhu H., 2003. Strain-dependent variability in growth and survival of *Escherichia coli* in agricultural soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 44 (3), 303–308.
- Traczewska T.M., 2011. Biologiczne metody oceny skażenia środowiska. Wyd. OWPW, Wrocław.
- Tyski, S., Rogulska B., 1999. Mikrobiologiczne kryteria jakości wody przeznaczonej do różnych celów – obowiązujące zalecenia i przepisy oraz projekty nowelizacji. *Mikrob. Med.* 4 (21), 9–18.
- Uhlířová E., Šantrůčková H., 2003. Growth rate of bacteria is affected by soil texture and extraction procedure. *Soil Biol. Biochem.* 35 (20), 217–224.
- Van Elsas J.D., Semenov A.V., Costa R., Trevors J.T., 2011. Survival of *Escherichia coli* in the environment: fundamental and public health aspects. *The ISME Journal* 5, 173–183.
- Viau E.J., Goodwin K.D., Yamahara K.M., Layton B.A., Sassoubre L.M., Burns S.L., Tong H.I., Wong S.H.C., Lu Y., Boehm A.B., 2011. Bacterial pathogens in Hawaiian coastal streams. Associations with fecal indicators, land cover, and water quality. *Water Res.* 45 (11), 3279–3290.
- Visser, S., Parkinson, D., 1992. Soil biological criteria as indicators of soil quality: soil microorganisms. *American Journal of Alternative Agriculture* 7, 33–37.
- Voidarou, C., Bezirtzoglou E., Alexopoulos A., Plessas S., Stefanis C., Papadopoulos I., Vavias S., Stavropoulou E., Fotou K., Tzora A., Skoufos I., 2011. Occurrence of *Clostridium perfringens* from different cultivated soils. *Anaerobe* 17 (6), 320–324.
- Whitman R.L., Shively D.A., Pawlik H., Nevers M.B., Byappanahalli M.N., 2003. Occurrence of *Escherichia coli* and enterococci in *Cladophora* (*Chlorophyta*) in nearshore water and beach sand of Lake Michigan. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4714–4719.
- Zagroda B., Olańczuk-Neymann K., 2001. Ochrona i rekultywacja podłoża gruntowego. Wyd. WPG, Gdańsk.
- Zmysłowska J., Filipowska Z., Gołaś I., Korzeniewska E., Lewandowska D., 2002. Mikrobiologia ogólna i środowiskowa. Teoria i ćwiczenia. Wyd. UWM, Olsztyn.

INDICATOR MICROORGANISMS IN ASSESSMENT OF SOIL SANITARY CONDITION

Summary. Soil plays a fundamental role in regulation of amount of pollutants in ecosystems. It can reduce pollution or to immobilize them and thus be used to assess the environment condition in terms of biology. The soil can prevent pollution, until it exceeded its capacity and retained biological activity. The use of living organisms in biomonitoring is extremely useful to assess the condition and contamination of the environment because they are the authoritative and reliable source of information about the processes occurring in the soil. Good bio-indicators can be easy to identify and cultivation organisms, quickly and unambiguously reacting to the changes in the environment, and allowing to assess the

degree and direction of changes in the natural environment. Depending on the direction and scope of the environmental research as indicator organisms can be assumed the total number of basic groups of microorganisms in the environment (bacteria, fungi, actinomycetes) and also the microorganisms active in many processes as nitrification, denitrification, atmospheric nitrogen fixation and others. Undoubtedly, we should distinguish between bioindicators, which react and detect changes in the environment of those whose presence (zymogens) already proves microbiological contamination of soils. The presence of indicator microorganisms in the soil reflects not only the degree of contamination of the soil environment but also provides information on the potential risk of crops contamination and the threat of human and animal health. Today, range of research methods and evaluation criteria for the sanitary condition of the soil is still a major problem of environmental tests. Though increasingly in the assessment of the environment routinely are used bioindicators this is due to the lack of a universally applicable standard values or reference, selection of appropriate indicators to make an objective assessment of the health of soils often depends on the subjective decision of the investigator. Therefore, this study attempts to show some methods of qualitative assessment of the sanitary condition of the soil environment based on selected microbiological indicators. Good indicators in assessing the state of the environment are microorganisms constantly inhabiting the gastrointestinal tract of humans and animals and pathogens that may constitute a danger to the health people having contact with contaminated soil. The presence of pathogen in the soil may also cause contamination of crops and hence food and feed. Thus, the paper characterizes also the standards and microorganisms recommended in the soil sanitary evaluation, mainly based on number or titre of coliform bacteria, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Streptococcus faecalis*, endospore forming sulfite-reducing bacteria – *Clostridium perfringens*.

Key words: soil, microorganisms, sanitary indicators