

WPLYW TEMPERATURY NA PRZEŻYWALNOŚĆ PAŁECZEK *Salmonella* W OSADACH ŚCIEKOWYCH

Katarzyna Budzińska, Anita Jurek, Magdalena Michalska, Krzysztof Berleć

Katedra Higieny Zwierząt i Mikrobiologii Środowiska,
Akademia Techniczno-Rolnicza im. J.J. Śniadeckich w Bydgoszczy

Wstęp

Sanitarne właściwości osadów ściekowych mają zmienny charakter i zależą od standardu życia, stanu zdrowotnego mieszkańców na danym terenie, rodzaju oczyszczanych ścieków oraz stosowanych metod przeróbki osadów. Większą część zanieczyszczeń mikrobiologicznych w osadach stanowią bakterie. Do najczęściej izolowanych należą *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium perfringens*, *Yersinia enterocolitica*, *Streptococcus faecalis*, *Enterobacter spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium spp.*, *Campylobacter spp.*, *Klebsiella spp.*, *Serratia spp.*, *Proteus spp.* i inne [KOSAREWICZ i in. 1999]. Sposób wykorzystania osadów ściekowych uzależniony jest głównie od ich właściwości nawozowych oraz od zawartości substancji toksycznych i chorobotwórczych mikroorganizmów. Duże zagrożenie stanowią organizmy patogenne, w tym pałeczki *Salmonella*. Bakterie te są odporne na niekorzystne warunki środowiska i są w stanie przeżyć w nich długie tygodnie, a nawet lata. W warunkach terenowych *Salmonella* przeżywała w gnojowicy bydłowej do 296 dni [KLUCZEK 1986]. Z badań sanitarnych osadów ściekowych wynika, że bakterie z rodzaju *Salmonella* występują w około 62% prób osadów przefermentowanych. Obecność tych drobnoustrojów w jednoznaczny sposób dyskwalifikuje takie osady do rolniczego wykorzystania bez uprzedniego procesu higienizacji. Ważnym czynnikiem wpływającym na przeżywalność *Salmonella* w osadach ściekowych jest rodzaj osadów i temperatura.

W związku z tym podjęto badania, których celem było prześledzenie przeżywalności pałeczek *Salmonella senftenberg* w osadach ściekowych w różnych warunkach temperaturowych.

Materiał i metody badań

Przedmiotem badań były osady powstałe w wyniku mechaniczno-biologicznego oczyszczania ścieków komunalnych. Doświadczenie prowadzono w okresie

od kwietnia do grudnia 2004 roku. Do badań pobierano dwa rodzaje osadów:

- po kwaśnej fermentacji z zagęszczaczko-fermenterów (zawartość suchej masy w granicach od 3,8% do 4,8%, pH od 4,9 do 5,5), (osad I);
- po fermentacji metanowej, a następnie odwodniane na prasach taśmowych (zawartość suchej masy od 19,2% do 22,3, pH od 5,9 do 6,9), (osad II).

Materiał doświadczalny o masie 3000 g (osad przefermentowany) oraz 3000 ml (osad po fermentacji kwaśnej) pobierano zgodnie z normą PN-EN ISO 5667-13:2004. W pierwszym etapie badań przygotowywano zawiesinę bakteryjną. Przygotowano cztery próby osadu przefermentowanego i cztery próby osadu po fermentacji kwaśnej, które umieszczono w szklanych kolbach o pojemności 1000 ml. Do każdej z nich dodano uprzednio przygotowaną zawiesinę bakteryjną w ilości 10 ml na każde 200 g lub 200 ml osadu. Następnie oznaczono liczbę *S. senftenberg* w 1 ml lub 1 g zaszczipionych osadów (próba wyjściowa). Jednocześnie, przygotowane próby osadu po fermentacji kwaśnej i metanowej umieszczono w różnych temperaturach: A – 4°C, B – 20°C, C – 30°C, D – 40°C. Próby do badań bakteriologicznych pobierano w różnych odstępach czasu, co było uzależnione od temperatury, w której przechowywano osady. Z temperatury 4 i 20°C próby pobierano średnio co 7 dni, natomiast próby z temperatury 30 i 40°C pobierano codziennie. Pierwszym etapem identyfikacji *Salmonella* było przednamnażanie w zbuforowanej wodzie peptonowej. Kolejnym etapem było selektywne namnażanie na płynnej pożywce wybiórczo-namnażającej wg Rappaporta z dodatkiem tetratronianu i zieleni malachitowej. W dalszej kolejności hodowle przeniesiono na podłoże agarowe BPLA z zielenią brylantową, czerwienią fenolową i laktozą oraz na podłoże agarowe XLD z ksylozą, lizyną i dezoksykholanem. Typowe kolonie *S. senftenberg* W 775 na podłożu BPLA rosły w postaci bladobiałych kolonii, wokół których występowało charakterystyczne zabarwienie agaru na różowo. Na agarze XLD typowe kolonie bakterii rosły w postaci drobnych kolonii z czarnym środkiem, otoczone jasnoczerwoną strefą. Końcowa identyfikacja polegała na zastosowaniu testów serologicznych – surowicy poliwalentnej HM i mikrotestu API 20 E. Uzyskane wyniki zweryfikowano i poddano analizie statystycznej.

Wyniki i dyskusja

Zanieczyszczenie bakteriami patogennymi osadów ściekowych oraz fakt intensywnego ich rozprzestrzeniania stwarza poważny problem w aspekcie biobezpieczeństwa środowiska. Z przedstawionych przez licznych autorów danych wynika, że w osadach występuje znaczna liczba pałeczek *Salmonella* rzędu 10^2 – 10^5 jtk·g⁻¹ [YANKO i in. 1995; BUDZIŃSKA 1999]. Osady ściekowe nie stanowią dla bakterii allochtonicznych naturalnego miejsca ich bytowania i po pewnym czasie ulegają samoistnemu procesowi eliminacji. W doświadczeniu określono przeżywalność w osadach ściekowych *S. senftenberg* W 775, ze względu na fakt, że szczep ten cechuje duża termooporność, może stanowić mikroorganizm modelowy dla tego typu badań. Zmiany liczebności populacji tych bakterii w badanych osadach przedstawiono w tabelach 1 i 2. W doświadczeniu po wprowadzeniu zawiesiny bakteryjnej do osadu po fermentacji kwaśnej (osad I) liczba *S. senftenberg* wyno-

siła $9,5 \cdot 10^9$ jtk·ml⁻¹, natomiast w osadzie po fermentacji metanowej (osad II) $4,5 \cdot 10^8$ jtk·g⁻¹. W trakcie trwania eksperymentu odnotowano zjawisko obumierania komórek bakterii. Najdłużej odnotowano występowanie pałeczek *Salmonella* w osadach w temperaturze 4°C. W 24 dniu trwania doświadczenia ich liczba wynosiła $9,0 \cdot 10^1$ jtk·ml⁻¹ (osad I) i $2,0 \cdot 10^2$ jtk·g⁻¹ (osad II). W obydwóch osadach w temperaturze 20°C czas przeżywania bakterii był nieco krótszy. Już w 20 dniu trwania doświadczenia liczebność wynosiła $1,5 \cdot 10^2$ jtk·ml⁻¹ i $7,5 \cdot 10^2$ jtk·g⁻¹, natomiast w dniu 22 eksperymentu, nie stwierdzono obecności tych bakterii w analizowanym materiale (tab. 1).

Tabela 1; Table 1

Liczba pałeczek *S. senftenberg* w osadzie po fermentacji kwaśnej i metanowej w temperaturze 4 i 20°C

Number of *S. senftenberg* in sludge after acid and methane fermentation at 4°C and 20°C

Dni doświadczenia Days of experiment	Liczba <i>S. senftenberg</i> jtk·ml ⁻¹ po fermentacji kwaśnej (osad I) Number of <i>S. senftenberg</i> jtk·ml ⁻¹ after acid fermentation (sludge I)		Liczba <i>S. senftenberg</i> jtk·g ⁻¹ po fermentacji metanowej (osad II) Number of <i>S. senftenberg</i> jtk·g ⁻¹ in sludge after methane fermentation (sludge II)	
	temp. 4°C	temp. 20°C	temp. 4°C	temp. 20°C
Pr. wyjściowa; Initial sample	$9,5 \cdot 10^9$	$9,5 \cdot 10^9$	$4,5 \cdot 10^8$	$4,5 \cdot 10^8$
7	$9,5 \cdot 10^9$	$7,5 \cdot 10^6$	$1,5 \cdot 10^8$	$1,2 \cdot 10^7$
14	$2,0 \cdot 10^8$	$4,5 \cdot 10^5$	$9,5 \cdot 10^5$	$4,5 \cdot 10^4$
16	$3,0 \cdot 10^6$	$9,5 \cdot 10^3$	$1,5 \cdot 10^5$	$2,5 \cdot 10^4$
18	$2,5 \cdot 10^4$	$1,5 \cdot 10^3$	$2,5 \cdot 10^3$	$9,0 \cdot 10^3$
20	$1,5 \cdot 10^2$	$1,5 \cdot 10^2$	$9,0 \cdot 10^2$	$7,5 \cdot 10^2$
22	$1,5 \cdot 10^2$	n.w.	$2,0 \cdot 10^2$	n.w.
24	$9,0 \cdot 10^1$	n.w.	$2,0 \cdot 10^2$	n.w.
26	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.

n.w. nie wykryto; not detected

STRAUCH [1991] podaje, że pałeczki z rodzaju *Salmonella* najdłużej przeżywają w osadach w temperaturze poniżej 10°C przy zawartości suchej masy ponad 5%. W temperaturze 30°C stwierdzono szybsze tempo inaktywacji drobnoustrojów patogennych w biomacie obydwóch osadów, przy czym po fermentacji kwaśnej izolowano pałeczki *Salmonella* po raz ostatni w 9 dniu badań ($7,5 \cdot 10^2$ jtk·ml⁻¹), (tab. 2). Nieco inaczej zachowywały się badane bakterie w osadach poddanych metanowej fermentacji, w których jeszcze w 11 dniu doświadczenia występowały w ilości $4,0 \cdot 10^0$ jtk·g⁻¹. Temperatura 40°C wpływała najbardziej destruktywnie na eliminację *S. senftenberg* z badanego materiału. W 6 dniu doświadczenia wyizolowano z osadu po fermentacji kwaśnej bakterie, których liczba wynosiła $4,5 \cdot 10^1$ jtk·ml⁻¹. Natomiast po tygodniu nie stwierdzono obecności bakterii. Jeszcze szybciej nastąpiła eliminacja tych mikroorganizmów z osadów po procesach

metanowej przeróbki. Komórki bakteryjne wykryto w 5 dniu doświadczenia w liczbie $1,5 \cdot 10^3$ jtk·g⁻¹. W kolejnych analizach pałeczek *Salmonella* nie stwierdzono.

Tabela 2; Table 2

Liczba pałeczek *S. senftenberg* w osadzie po fermentacji kwaśnej i metanowej w temperaturze 30 i 40°C

Number of *S. senftenberg* in sludge after acid and methane fermentation at 30°C and 40°C

Dni doświadczenia Days of experiment	Liczba <i>S. senftenberg</i> jtk·ml ⁻¹ po fermentacji kwaśnej (osad I) Number of <i>S. senftenberg</i> jtk·ml ⁻¹ after acid fermentation (sludge I)		Liczba <i>S. senftenberg</i> jtk·g ⁻¹ po fermentacji metanowej (osad II) Number of <i>S. senftenberg</i> jtk·g ⁻¹ after methane fermentation (sludge II)	
	temp. 30°C	temp. 40°C	temp. 30°C	temp. 40°C
Pr. wyjściowa; Initial sample	9,5·10 ⁹	9,5·10 ⁹	4,5·10 ⁹	4,5·10 ⁹
1	7,5·10 ⁸	2,0·10 ⁹	1,5·10 ⁹	2,0·10 ⁹
2	1,5·10 ⁸	1,5·10 ⁷	7,5·10 ⁸	1,4·10 ⁸
3	1,5·10 ⁸	9,5·10 ⁵	4,5·10 ⁷	9,5·10 ⁴
4	4,5·10 ⁷	2,0·10 ⁵	2,0·10 ⁶	4,5·10 ⁴
5	4,5·10 ⁶	2,5·10 ³	7,5·10 ⁵	1,5·10 ³
6	1,5·10 ⁶	4,5·10 ¹	7,5·10 ⁴	n.w.
7	9,5·10 ⁴	n.w.	9,5·10 ⁴	n.w.
8	2,0·10 ⁴	n.w.	7,0·10 ¹	n.w.
9	7,5·10 ²	n.w.	9,5·10 ¹	n.w.
10	n.w.	n.w.	4,0·10 ¹	n.w.
11	n.w.	n.w.	4,0·10 ⁰	n.w.
12	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.

n.w. nie wykryto; not detected

Analiza równań regresji pozwoliła określić tempo eliminacji komórek bakteryjnych z osadów po fermentacji kwaśnej w temperaturze 4°C na 0,42 log/dzień. W osadach po fermentacji metanowej tempo eliminacji pałeczek w temperaturze 4°C wynosiło 0,36 log/dzień, przy wysoko istotnym współczynniku korelacji. Maksymalny czas przeżycia pałeczek *Salmonella* obliczony z równań regresji wynosił odpowiednio 28,33 i 28,13 dni. Natomiast w temperaturze 20°C szybkość redukcji bakterii wynosiła 0,41 log/dzień, a maksymalny czas przeżywania pałeczek *Salmonella* wynosił 24,87 dni (osad I) oraz 0,36 log/dzień i 26,13 dni (osad II). W osadzie po fermentacji kwaśnej szybkość obumierania komórek *Salmonella* w temperaturze 30°C wynosiła 0,74 log/dzień, natomiast w temperaturze 40°C: 1,39 log/dzień. Przy czym współczynniki korelacji były wysoko istotne i wynosiły odpowiednio: -0,83 i -0,97. Maksymalne czasy przeżycia bakterii obliczone na podstawie równań regresji wynosiły odpowiednio: 13,21 dni w temperaturze 30°C oraz 7,44 w temperaturze 40°C. Stwierdzono, że w osadach ściekowych poddanych fermentacji metanowej obumieranie komórek *Salmonella* następowało szybciej. Tempo eliminacji bakterii w temperaturze 30°C wynosiło 0,87 log/dzień, natomiast 1,57 log/dzień w temperaturze 40°C. Maksymalny teoretyczny czas przeżycia obliczony na podstawie równań regresji wynosił odpowiednio 11,49 i 6,69 dni (tab. 3).

Wielu autorów jest zdania, że czas przeżywania pałeczek *Salmonella* zależy przede wszystkim od temperatury, zawartości suchej masy, wilgotności i rodzaju podłoża oraz serotypu. W osadach gnilnych o temperaturze 10–20°C *Salmonella spp.* może przeżywać 83 dni, a *S. typhimurium* do 180 dni. W osadzie suchym z kolei czas przeżywania tych bakterii wynosi 120, a w świeżym kale nawet 930 dni. *S. enteritidis* w osadzie gnilnym o temperaturze 12°C przeżywa 143 dni, a w suchym o temperaturze 26–32°C do 43 dni [MÜLLER 1984]. Badania nad przeżywalnością *Salmonella typhimurium* w osadach prowadzili VENGLOVSKÝ i in. [1998]. Osad surowy zaszczyony był *S. typhimurium* i umieszczony w kontenerach. Uzyskane wyniki wykazały, że zimą, kiedy temperatura była niższa niż 10°C czas przeżywania bakterii wynosił 85 dni. Natomiast latem, przy temperaturze wyższej niż 20°C czas przeżycia był znacznie krótszy i wynosił 26 dni. Według AHMEDA i SORENSENA [1997] przeżywalność *S. typhimurium* w odwodnionych osadach komunalnych składowanych na lagunach wynosi około 90 dni.

LUCERO-RAMIREZ i MALINA [2000] w osadach surowych i przefermentowanych odnotowali czas przeżywania *Salmonella* w temperaturze 25 i 35°C przez 45 dni w warunkach beztlenowych. Tempo redukcji bakterii w temperaturze 25°C wynosiło 1,7 log/dzień, a w temperaturze 35°C 2,06 log/dzień. Natomiast w warunkach tlenowych, w temperaturze 15°C czas przeżywania *Salmonella spp.* wynosił 60 dni, a w temperaturze 20°C – 40 dni. Badania prowadzone były w warunkach laboratoryjnych.

Tabela 3; Table 3

Proste regresji przeżywalności pałeczek *S. senftenberg* w osadzie po fermentacji kwaśnej i metanowej pod wpływem różnych temperatur

Regression lines of *S. senftenberg* survival time in sludge after acid and methane fermentation under the influence of different temperatures

Próba Sample tested		Równanie prostej regresji Equation of regression line	r ²	Współczynnik korelacji Correlation coefficient	Współczynnik regresji Regression coefficient	Maks. czas przeżycia (dni) Max. survival time (days)
A	Osad I; Sludge I	$y = -0,42x + 11,90$	0,87	-0,93	-2,08	28,33
	Osad II; Sludge II	$y = -0,36x + 10,13$	0,90	-0,93	-2,52	28,13
B	Osad I; Sludge I	$y = -0,41x + 10,20$	0,96	-0,98	-2,36	24,87
	Osad II; Sludge II	$y = -0,36x + 9,41$	0,93	-0,97	-2,57	26,13
C	Osad I; Sludge I	$y = -0,74x + 9,78$	0,83	-0,91	-1,13	13,21
	Osad II; Sludge II	$y = -0,87x + 10,00$	0,97	-0,98	-0,87	11,49
D	Osad I; Sludge I	$y = -1,39x + 10,35$	0,97	-0,99	-0,70	7,44
	Osad II; Sludge II	$y = -1,57x + 10,51$	0,97	-0,98	-0,62	6,69

temperatura; temperature:

A 4°C B 20°C
C 30°C D 40°C

Czas przeżywania *S. senftenberg* w przeprowadzonych badaniach był stosunkowo krótki, jednak może stanowić realne zagrożenie skażenia gleby, wód gruntowych, roślin oraz zdrowia ludzi i zwierząt. W związku z tym osady ściekowe, przed ich użytkowaniem rolniczym należy poddawać higienizacji.

Wnioski

1. Tempo eliminacji *Salmonella senftenberg* w osadzie po fermentacji kwaśnej było szybsze w porównaniu do osadów poddanych fermentacji metanowej.
2. W obydwóch osadach stwierdzono, że wraz ze wzrostem temperatury przetrzymywania osadów czas przeżywania bakterii był coraz krótszy.

Literatura

- AHMED A.U., SORENSEN D.L. 1997. *Autoheating and pathogens destruction during storage of dewatered biosolids with minimal mixing*. Water Environ. Res. 69: 81.
- BUDZIŃSKA K. 1999. *Mikrobiologiczna ocena osadów z oczyszczalni ścieków komunalnych*. Prace Kom. Nauk Roln. i Biol., BTN Ser. B, Bydgoszcz, 45: 177–188.
- KLUCZEK J.P. 1986. *Aspekty sanitarno-higieniczne ścieków odzwierzęcych*. Prace Kom. Nauk Roln. i Biol., BTN Bydgoszcz, 24: 43–88.
- KOSAREWICZ O., FIRLUS J., UNIEJEWSKA G. 1999. *Usuwanie mikroorganizmów chorobotwórczych w oczyszczalniach ścieków miejskich*. GWiTS 76(8): 292–297.
- LUCERO-RAMIREZ B., MALINA J. 2000. *The off time and temperature on the fate on pathogens and indicator bacteria during municipal wastewater sludge-mesophilic anaerobic digestion, air-drying, and composting*. The University of Texas at Austin, www.crrw.utexas.edu.
- MÜLLER F. 1984. *Die seldstreinigung fäkal-kontaminierter Böden*. Dissertations – arbeit Universität Jena.
- STRAUCH D. 1991. *Survival of pathogenic microorganisms and parasites in excreta, manure and sewage sludge*. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 10(3): 813–846.
- VEGLOVSKÝ J., PLACHÁ I., SASÁKOVÁ N., PARA L. 1998. *Comparison of the survival of Salmonella typhimurium in the solid fraction from agricultural wastewater plant in summer and winter seasons*. The 8th International Conference of European Cooperative Research Network on Recycling of Agricultural Municipal and Industrial Residuals in Agriculture. France, Rennes: 355–362.
- YANKO W.A., WALKER A.S., JACKSON J.L., LIBAO L.L., GARICIA A.L. 1995. *Enumerating Salmonella in biosolids for compliance with pathogen regulatins*. Wat. Environ. Res. 67: 364–370.

Słowa kluczowe: *Salmonella*, osady ściekowe, kompost

Streszczenie

Badania wykazały, że najdłużej przeżywały pałeczki *S. senftenberg* w temperaturze 4°C. Dzienny czas przeżycia określony na podstawie równań prostych regresji był zbliżony dla obydwóch rodzajów osadów i wynosił od 28,13 do 28,33. W temperaturze 20°C pałeczki były izolowane przez 24,87 dni w osadzie po fermentacji kwaśnej, natomiast w osadzie fermentacji metanowej izolowano je 26,13 dni. Szybkość obumierania komórek *Salmonella* w temperaturze 30°C wynosiła

-0,74 log/dzień (osad po fermentacji kwaśnej) i -0,87 log/dzień (osad po fermentacji metanowej), natomiast w temperaturze 40°C tempo eliminacji pałeczek *Salmonella* wynosiło odpowiednio -1,39 i -1,57 log/dzień, przy wysoko istotnych współczynnikach korelacji.

INFLUENCE OF THE TEMPERATURE ON SURVIVAL OF *Salmonella* BACILLI IN SEWAGE SLUDGE

Katarzyna Budzińska, Anita Jurek, Magdalena Michalska, Krzysztof Berleć
Department of Animal Hygiene and Microbiological Environment,
Academy of Technology and Agriculture, Bydgoszcz

Key words: *Salmonella*, sewage sludge, compost

Summary

The research indicates that the rods of *S. senftenberg* at 4°C survived for the longest time. Daily survival time determined on the basis of regression line equations was similar for both types of sludge and varied from 28.13 to 28.33. At 20°C the rods were isolated for 24.87 days in the sludge after acid fermentation, while in the sludge of methane fermentation they were isolated for 26.13 days. Elimination rate of *Salmonella* cells at 30°C amounted to -0.74 log/day (sludge after acid fermentation) and -0.87 log/day (sludge after methane fermentation), while at 40°C the elimination rate of *Salmonella* rods amounted to -1.39 and -1.57 log/day, respectively, with highly significant correlation coefficients.

Dr inż. Katarzyna **Budzińska**
Katedra Higieny Zwierząt i Mikrobiologii Środowiska
Akademia Techniczno-Rolnicza im. J.J. Śniadeckich
ul. Mazowiecka 28
85-084 BYDGOSZCZ