

STEFANIA ZIEMIŃSKA, STEFANIA HAMAN, DANUTA MIŁKOWSKA-
-JANKOWSKA, JADWIGA MALESZEWSKA

PACIORKOWCE KAŁOWE JAKO WSKAŹNIKI ZANIECZYSZCZENIA KAŁOWEGO WODY

CZ. IV. PRZEŻYWALNOŚĆ PACIORKOWCÓW KAŁOWYCH W WODZIE *)

Z Zakładu Higieny Komunalnej Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie
p.o. Kierownika: doc. dr hab. S. Maziarka

Paciorkowce kałowe przeżywały w wodzie naturalnej w temperaturze 28°C i 20°C krócej niż Escherichia coli, natomiast w temperaturze 6°C — dłużej lub tak samo, w zależności od gatunku.

Wyboru jakiegokolwiek drobnoustroju jako wskaźnika zanieczyszczenia kałowego wody (lub innego środowiska) dokonuje się na podstawie szeregu kryteriów. Do najważniejszych należy zaliczyć: 1) stałe i obfite występowanie danego mikroorganizmu w kale ludzkim i ewentualnie w kale zwierząt stałocieplnych a tym samym i w ściekach bytowych oraz 2) nieobecność danego mikroorganizmu w otaczającym środowisku nie zanieczyszczonym wydalaminami ludzkimi i zwierzęcymi. W związku z tym ostatnim kryterium istotne znaczenie przy ocenie drobnoustroju jako wskaźnika zanieczyszczenia kałowego wody, ma poznanie jego zdolności do przetrwania w wodach naturalnych.

Badania dotyczące występowania paciorkowców kałowych w kale ludzi, ściekach bytowych oraz wodach różnego rodzaju, o różnym stopniu zanieczyszczenia, były przedmiotem wcześniejszych prac [5, 7, 9, 10, 11]. Celem obecnej pracy było określenie stopnia przeżywalności paciorkowców kałowych w wodzie w porównaniu z *Escherichia coli*.

MATERIAŁ I METODYKA

Szczepy testowe

Do badań użyto 5 szczepów paciorkowców kałowych a mianowicie *Streptococcus faecalis* i jego dwie odmiany *liquefaciens* i *zymogenes* oraz *Streptococcus faecium* i *Streptococcus durans*, uważany ostatnio za odmianę *S. faecium* lub za identyczny gatunek [1, 2, 9]. Wszystkie szczepy pochodziły z kolekcji Instytutu Pasteura w Lille. Ponadto użyto szczepu *Escherichia coli* wyizolowanego z kału ludzkiego.

Woda

Przeżywalność testowych szczepów badano w wodzie pochodzącej ze źródła naturalnego, nieznacznie lub średnio zanieczyszczonej pod względem bakteriologicznym. W pierwszym przypadku nie stwierdzono w wodzie bakterii grupy *coli* i paciorkowców kałowych w 100 ml, w drugim przypadku wskaźnik *coli* wynosił 5—9 w 100 ml, zaś paciorkowców kałowych 1—9 w 100 ml. Liczba kolonii bakterii wy-

*) Praca wykonana w ramach problemu MR-12.

hodowanych z 1 ml wody na agarze odżywcym w temp. 20°C po 72 h wynosiła od 100 do około 400, zaś wyhodowanych w temp. 37°C w ciągu 24 h od 20 do 50. Różne ilości bakterii występowały w zależności od pory roku. Pod względem fizyko-chemicznym woda odpowiadała w zasadzie wymaganiom sanitarnym, określonym dla wody do picia; jedyne przekroczenie dotyczyło zawartości azotanów (od 12—20 mg N/l).

Przebieg doświadczeń

Doświadczenia polegały na dodaniu znanej liczby testowych szczepów do 1 l wody i badaniu liczby pozostałych testowych szczepów w określonej objętości wody, po odpowiednim czasie przetrzymywania zawiesiny w różnych temperaturach.

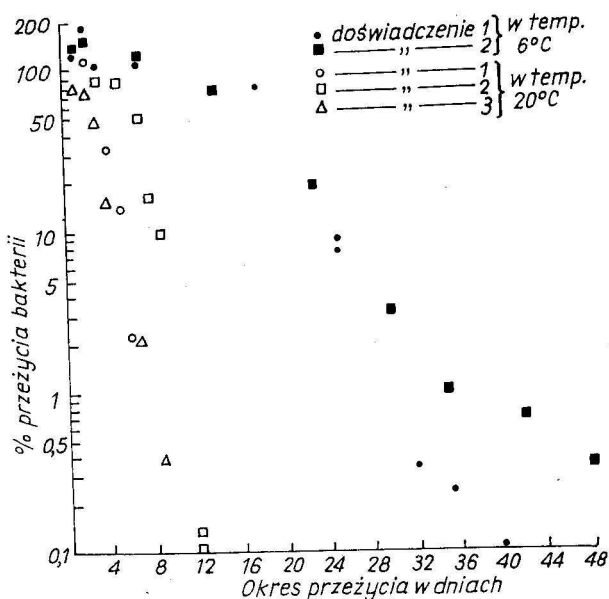
Bakterie dodawano w takiej ilości, aby otrzymać ich stężenie w wodzie rzędu $2-5 \cdot 10^2$ w 1 ml. W kolejnych doświadczeniach (wariantach) badano zachowanie się poszczególnych szczepów dodawanych w czystych hodowlach oraz dodawanych w mieszaninie: szczep paciorkowca kałowego i *E. coli*. Doświadczenia prowadzono w temperaturze 6°C, około 20°C (pokojowej) i 28°C.

Liczbę dodanych bakterii określano zarówno kontrolując wyjściową, dodawaną zawiesinę jak i określając stężenie bakterii w badanej wodzie bezpośrednio po dodaniu *inoculum*. Stopień przeżycia określano przez pobieranie odpowiedniej objętości próbki z każdej butelki, początkowo codziennie — do czwartego dnia doświadczenia, a następnie co 2, 3 dni i rzadziej w zależności od szybkości wymierania testowych szczepów. Każdorazowo prowadzono badania kontrolne wody bez dodatku testowych szczepów, określając liczbę bakterii grupy *coli*, paciorkowców kałowych oraz liczbę bakterii hodowanych na agarze odżywcym w temperaturze 20 i 37°C [8, 9].

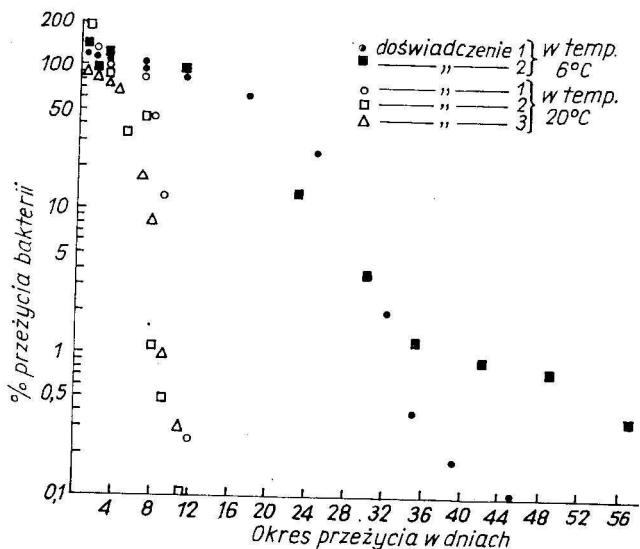
Bakterie grupy *coli*, *E. coli* oraz paciorkowce kałowe wykrywano metodą filtrów membranowych (FM) odpowiednio na agarze Endo-FM (3) oraz na podłożu *Slanetza* [9]; każde oznaczenie wykonywano, stosując 2 równoległe filtry dla każdej objętości próbki. Każdy wariant doświadczenia powtarzano dwu- lub trzykrotnie.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

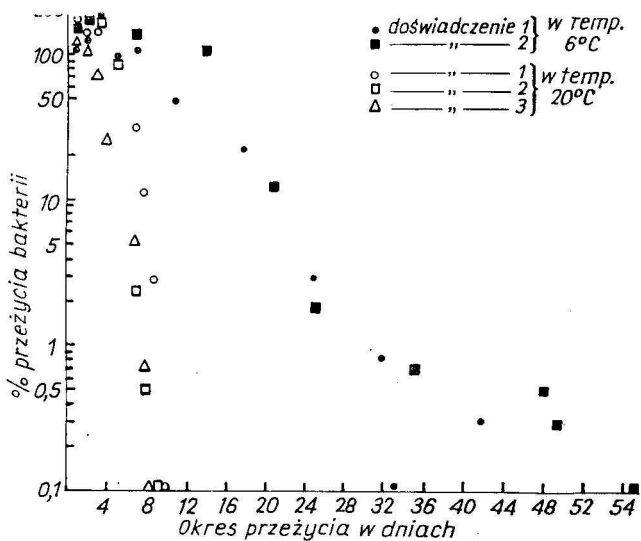
Wyniki dotyczące przeżywalności poszczególnych szczepów w temperaturze 20 i 6°C przedstawiono na rycinach 1—6.



Ryc. 1. Przeżywalność *Streptococcus faecalis* w wodzie w temp. 6 i 20°C.



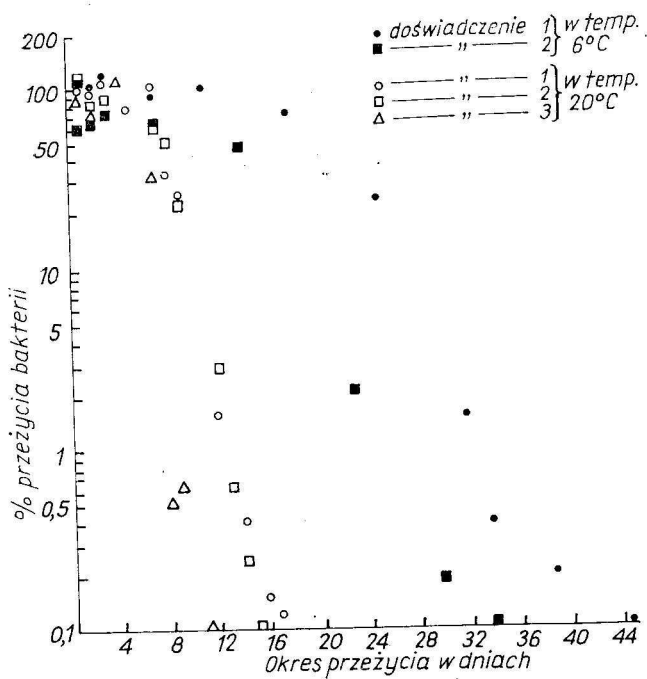
Ryc. 2. Przeżywalność *Streptococcus liquefaciens* w wodzie nieznacznie zanieczyszczonej w temp. 6 i 20°C.



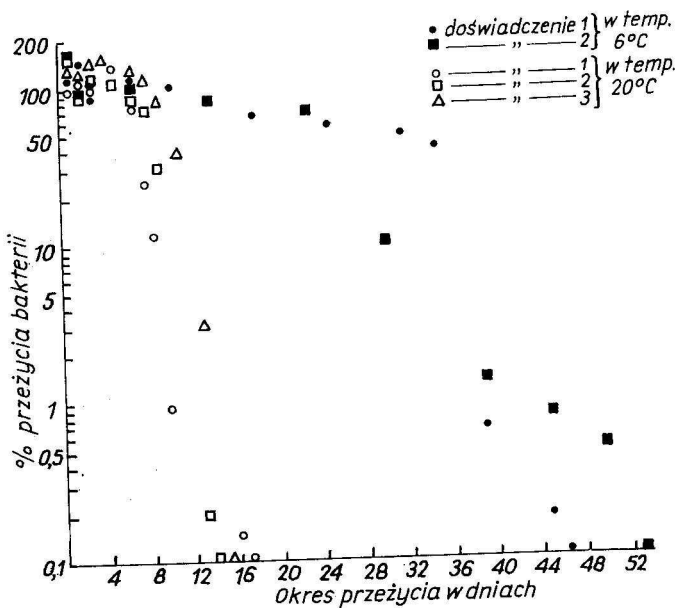
Ryc. 3. Przeżywalność *Streptococcus zymogenes* w wodzie nieznacznie zanieczyszczonej w temp. 6 i 20°C.

S. faecalis i jego odmiany *liquefaciens* i *zymogenes* przeżywały w temperaturze pokojowej 12 dni, zaś *S. faecium* i *S. durans* trochę dłużej, bo około 16 dni. W tych samych warunkach *E. coli* ginęły dopiero po 24 dniach lub nawet później.

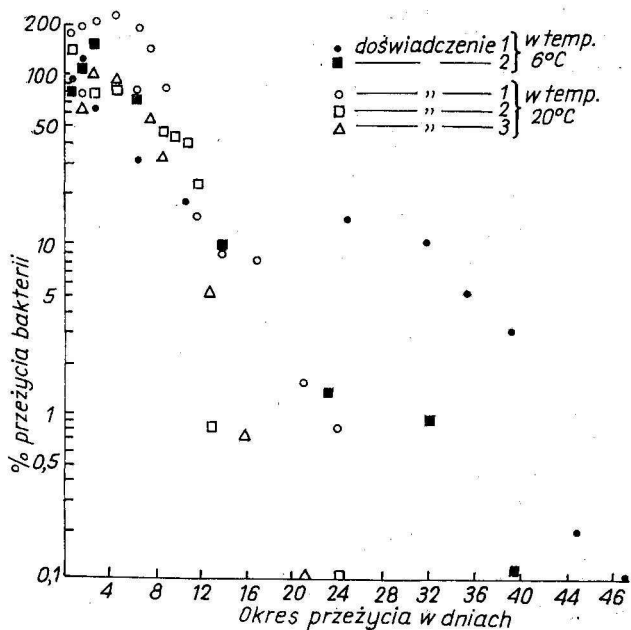
W temperaturze 6°C wszystkie badane szczepy przeżywały znacznie dłużej; wykrywano je jeszcze w wodzie, choć w bardzo małej ilości po 40 (i więcej) dniach doświadczenia. W tej temperaturze paciorkowce kałowe wykazywały tendencję do dłuższej przeżywalności niż *E. coli*.



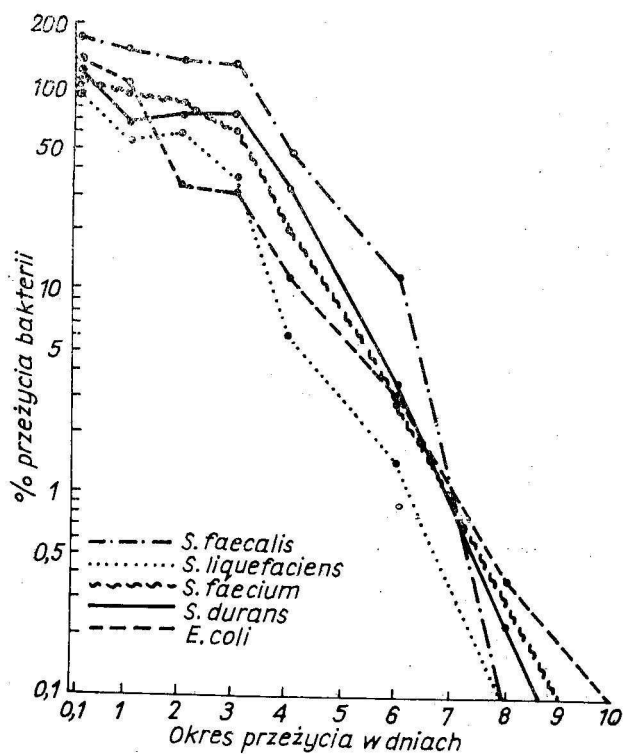
Ryc. 4. Przeżywalność *Streptococcus faecium* w wodzie nieznacznie zanieczyszczonej w temp. 6 i 20°C.



Ryc. 5. Przeżywalność *Streptococcus durans* w wodzie nieznacznie zanieczyszczonej w temp. 6 i 20°C.



Ryc. 6. Przeżywalność *Escherichia coli* w wodzie nieznacznie zanieczyszczonej w temp. 6 i 20°C.



Ryc. 7. Przeżywalność paciorkowców fekalnych i *Escherichia coli* w wodzie średnio zanieczyszczonej w temp. 28°C.

W temperaturze 28°C (ryc. 7) wszystkie szczepy wymierały szybciej niż w temperaturach niższych; paciorkowce kałowe w ciągu około 8 dni, *E. coli* w ciągu 10 dni.

W tabeli I zestawiono wyniki doświadczeń, w których dodawano do wody mieszaninę 1 szczepu paciorkowca kałowego i *E. coli* w stosunku 1:2. Wykonano po 2 doświadczenia (A i B) w temperaturze 6°C i 20°C.

Tabela I. Przeżywalność (w dniach) paciorkowców kałowych i *E. coli* występujących w wodzie w stosunku 1 : 2, w zależności od temperatury

Procent redukcji	6°C		20°C		6°C		20°C	
	<i>S. faecalis</i>				<i>E. coli</i>			
	A	B	A	B	A	B	A	B
99	30	50	13	13	21	30	16	18
100	> 50	> 71	16	22	40	50	34	35
<i>S. faecium</i>								
<i>E. coli</i>								
99	24	20	13	14	20	20	16	18
100	> 45	> 47	22	33	45	45	34	38

A, B — warianty doświadczenia

Dane zawarte w tabeli I choć różnią się nieco w wartościach bezwzględnych od wyników zilustrowanych rycinami, potwierdzają jednak spostrzeżenie, że w temperaturze 6°C paciorkowce kałowe powolniej wymierają niż *E. coli*, zaś w temperaturze 20°C szybciej. Różnicami tymi można by tłumaczyć otrzymane wcześniej dane o częstszym i obfitszym wykrywaniu paciorkowców kałowych w porównaniu z *E. coli* w tej samej rzece zimą w przeciwieństwie do okresu letniego [5, 7].

Natomiast badania Kjellandera [4] wykonywane przy użyciu specjalnych worków kolodionowych, zanurzonych w głębokiej studni o temperaturze około 5°C wykazały szybsze wymieranie naturalnej mieszaniny paciorkowców kałowych, pochodzących ze ścieków komunalnych w porównaniu do *E. coli*, obecnych również w tych samych ściekach w około pięciokrotnie większej ilości.

Z punktu widzenia sanitarnego bardzo istotna jest nie tylko długość okresu przeżycia badanych bakterii, ale również ich zachowanie w pierwszych dniach po dostaniu się do wody. Jak widać z rycin 1—6, z wyjątkiem nielicznych przypadków (*S. faecalis*, temp. 20°C — wszystkie 3 powtórzenia — ryc. 1; *S. faecium*, temp. 6°C, 1 powtórzenie — ryc. 4 oraz *E. coli*, temp. 20°C, 1 powtórzenie, ryc. 6) zaobserwowano w pierwszych 3 dniach doświadczenia wzrost liczby badanych bakterii, sięgający kilkudziesięciu procent; w jednym tylko doświadczeniu (*E. coli*, temp. 20°C) przekroczył on niewiele ponad 200% (tzn. podwoiła się liczba dodanych bakterii) i utrzymywał się około 6 dni.

Wydaje się jednak, że ten kilkudziesięcioprocentowy przyrost liczby bakterii nie może być tłumaczony rozmnażaniem się bakterii wskaźnikowych w wodzie, choć często przekraczał on wartość 35%, przyjęta dla tej metody jako błąd wynikający z nierównomiernego rozproszenia bakterii w wodzie i losowego pobierania próbek [6]. Za tym przemawiają następujące fakty:

1) zbyt mały wzrost liczby bakterii w porównaniu do ich początkowej wartości, biorąc pod uwagę rozmnażanie się bakterii w postępie geometrycznym,

2) nie notowana dotychczas w piśmiennictwie zdolność paciorkowców kałowych do rozmnażania się w temperaturze poniżej 10°C (zwłaszcza w wodzie); nawet w warunkach odpowiednich do hodowania, paciorkowce kałowe rosną na ogół dłużej niż np. bakterie grupy *coli* (zalecany zwykle okres hodowania paciorkowców kałowych wynoszący 48 h).

Przyczyną obserwowanego wzrostu początkowej liczby bakterii mógł być dodatkowy jeszcze (poza 35%) błąd zastosowanej metody oraz zjawisko rozchodzenia się komórek potomnych, dodawanych bakterii bezpośrednio ze świeżej hodowli, a więc możliwe, że znajdujących się bezpośrednio po podziale komórkowym; niewykluczona jest również możliwość „dokończenia” podziału komórek znajdujących się akurat w logarytmicznej fazie wzrostu. Podobny wzrost liczby bakterii, a nawet przetrwalników notowany i nie wyjaśniony był przez różnych badaczy również w procesach dezynfekcji i sterylizacji.

W celu choć częściowego wyjaśnienia przyczyny zwiększonej liczby bakterii w pierwszym okresie przebywania w wodzie, w szczególności określenia ewentualnego dodatkowego błędu metody wykonano szereg doświadczeń, zgodnie z zaleceniami Amerykańskiego Towarzystwa do spraw Standaryzacji Metod i Materiałów (ASTM) [6].

W badaniach porównywano: 1) metodę wykrywania bakterii dodawanych do wody — FM z metodą płytkową posiewu powierzchniowego, 2) filtry niemieckie firmy Sartorius i czeskie Synpor 5, 3) liczby kolonii na 5 równoległych płytkach, 4) liczby bakterii liczone przez 3 osoby.

Doświadczenia przeprowadzono w temperaturze 28°C, jako korzystniejszej do ewentualnego namnażania się bakterii w wodzie, przy czym liczby bakterii określano bezpośrednio po ich dodaniu i wymieszaniu, po 2 h (czas zbyt krótki do namnażania w wodzie) oraz po 24, 48 i 72 h.

W analizie statystycznej określono standardowe odchylenie, współczynniki zmienności oraz wartość D^2 (według wzoru):

$$D^2 = \frac{\sum (\bar{x} - x)^2}{x}$$

wartość D^2 większa niż wartość χ^2 dla $p \leq 0,05$ przy $n-1$ stopniach swobody ma wskazywać na to, że przyczyną nadmiernej zmienności jest nie tyle błąd metody ile nierównomierny rozkład bakterii w próbce [6].

Analiza statystyczna wykazała istnienie dodatkowego błędu metody. Jest on związany szczególnie z liczbą liczonych bakterii, znajdujących się na FM. Największy błąd popełniono w przypadku mniejszej niż 20 liczbie bakterii na FM. Również liczba bakterii badanych większa niż 120 (przy braku innych kolonii) powodowała znaczny błąd. Ze względu na stosunkowo mały optymalny zakres liczby badanych kolonii do liczenia na FM ϕ 50 mm (20—80 przy maksymalnej liczbie 120 wszystkich kolonii) różnice między poszczególnymi filtrowanymi objętościami próbki wody powinny być najwyżej pięciokrotne a nie dziesięciokrotne, jak to się zwykle zaleca.

Zastosowanie 5 powtórzeń dla każdego oznaczenia poza dokładniejszymi wynikami, wykazało niejednorodność czeskich filtrów Synpor 5. Niejednokrotnie otrzymywano duży rozrzut wyników z jednej objętości np. od 0 do 40 kolonii badanych. Z tego względu filtry Synpor 5 nie nadają

się do tego rodzaju badań, szczególnie jeśli niestosuje się co najmniej 5 równoległych powtórzeń.

Nie stwierdzono różnicy w wynikach, określonych przez różne osoby oraz nie stwierdzono różnicy w liczbie kolonii określanych metodą wysiewu powierzchniowego oraz przy zastosowaniu FM produkcji firmy Sartorius.

Badania wykonywane bezpośrednio po dodaniu bakterii do wody oraz po 2 h wykazały taką samą zmienność wyników jak badania wykonywane po 24, 48 i 72 h, potwierdzając przypuszczenie, że testowe szczepy nie namnażają się w badanej wodzie.

WNIOSKI

1. Przeżywalność badanych bakterii wskaźnikowych zależy od temperatury; im niższa temperatura tym dłuższa przeżywalność, szczególnie paciorkowców kałowych.

2. Paciorkowce kałowe przeżywają w temperaturze 28 i 20°C krócej niż *E. coli*, natomiast w temperaturze 6°C w zasadzie dłużej lub tak samo, w zależności od gatunku lub odmiany.

3. Mniejsze liczby paciorkowców kałowych w kale (9) oraz w ściekach (10), będących źródłem zanieczyszczenia wód naturalnych w porównaniu do *E. coli* oraz ich nieco krótsza na ogół przeżywalność, wskazuje na konieczność ustalenia mniejszych wartości liczbowych jako wymagań sanitarnych dla tych drobnoustrojów oraz odpowiedniej interpretacji wyników w zależności od pory roku i rodzaju wód (powierzchniowych lub gruntowych).

4. Nieznaczny wzrost (kilkadziesiąt%) liczby dodawanych bakterii, w pierwszym okresie (do 3 dni) przebywania w wodzie prawdopodobnie nie jest wynikiem namnażania się tych drobnoustrojów w wodzie, lecz błędem metody lub rozchodzenie się w wodzie komórek potomnych dodawanych bakterii ze świeżej hodowli.

С. Земињска, С. Хаман, Д. Милковска-Јанковска,

Ј. Малешевска

ФЕКАЛЬНЫЕ СТРЕПТОКОКИИ КАК ПОКАЗАТЕЛИ ФЕКАЛЬНОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ ВОДЫ

Ч. IV. Выживаемость фекальных стрептококков в воде

Резюме

Авторы исследовали выживаемость пяти штаммов фекальных стрептококков и одного штамма *Escherichia coli* в естественной воде незначительно или среднезагрязненной. Штаммы добавляли в чистой культуре в концентрации порядка $2-5 \times 10^2$ в 1 мл или в смеси: 1 штамм фекального стрептококка и *E. coli* в соотношении приблизительно 1:2. Исследования проводили при темп. 6°, 20° и 28°С.

Были установлены следующие периоды выживаемости в зависимости от температуры: фекальные стрептококки: при темп. 28°С — около 8 дней, при 20°С — 12—16 дней и при 6°С — свыше 45 дней; *E. coli*: при 28°С — 10 дней, при 20°С — 24 дня или больше, при 6°С — 40 дней и больше.

Исследования подтвердили общеизвестное явление более длительной выживаемости бактерий в воде по мере понижения температуры. Особенно отчетливо эти различия наблюдали в случае фекальных стрептококков. В результате этого была установлена большая выживаемость *E. coli* чем фекальных стрептококков при темп. 28°С и 20°С и меньшая или такая-же при темп. 6°С.

Меньшие, по сравнению с *E. coli*, количества фекальных стрептококков в фекалиях (9) или сточных водах (10), являющихся источником загрязнения естественных водоёмов, указывают на необходимость установления более низких количественных значений, как санитарных требований для стрептококков. Зато различия в выживаемости, зависящие от температуры, требуют соответствующей интерпретации в зависимости от времени года и характера вод: поверхностных или грунтовых. В случае этих последних температура воды обычно бывает ниже 20° C.

S. Ziemińska, S. Haman, D. Miłkowska-Jankowska,
J. Maleszewska

FAECAL STREPTOCOCCI AS INDICATORS OF FAECAL WATER CONTAMINATION

IV. Survival of faecal streptococci in water

Summary

The survival of 5 strains of faecal streptococci and 1 strain of *Escherichia coli* in natural water slightly or moderately contaminated was studied. The strain were added in pure culture in concentration of the order of $2-5 \times 10^2$ in 1 ml or in a mixture of one strain of faecal streptococcus and *E. coli* in a ratio of approximately 1:2. The investigations were carried out at the temperatures of 6°, 20° and 28°C.

The following survival length values were obtained depending on the temperature: about 8 days at 28°, 12–16 days at 20°, above 45 days at 6°C for faecal streptococci, and 10 days at 28°, 24 days at 20° (or longer) and 40 days or longer at 6°C for *E. coli*.

These investigations confirmed the generally known fact of longer survival of bacteria with decreasing temperature of the water. Particularly evident differences were found in the case of faecal streptococci. The survival length of *E. coli* was longer than that of faecal streptococci at 28°C and 20°C, and it was shorter or similar at 6°C.

Lower numbers of faecal streptococci in faeces (9) and in sewage (10), where these bacteria contaminate natural waters, in relation to *E. coli* point to the necessity of accepting lower counts of faecal streptococci as criteria to be met in sanitary requirements. On the other hand, differences of survival length related to temperature require different interpretation of the results depending on the season of the year and type of water (surface water or ground water, since in the latter case water temperature is usually below 20°C).

PIŚMIENNICTWO

1. Barnes E. N.: Distribution and properties of serological types of *Streptococcus faecium*, *Streptococcus durans* and related strains. — 2. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, wyd. 8, Williams and Wilkins co., Baltimore 1974. — 3. Buczowska Z., Ziemińska S., Geschwind Z.: Metodyka bakteriologicznego badania wody. Oznaczanie wskaźnika coli metodą filtrów membranowych. Wydawn. Metod. PZH 1965, Nr 3, zesz. 6. — 4. Kjellander J.: Enteric streptococci as indicators of faecal contamination of water. *Acta Path. Microb. Scand.* Suppl. 136, 48, 1960. — 5. Maleszewska J.: Występowanie enterokoków w Wiśle w rejonie Warszawy i Płocka. *Roczn. PZH* 1963, 14, 428. — 6. Protocol for collaborative testing of methods for microorganisms of health and sanitary significance. American Society for Testing and Materials 1977, D 19: 01:04:02. — 7. Ziemińska S.: Porównawcze badania nad występowaniem bakterii grupy coli i enterokoków w wodzie powierzchniowej. *Roczn. PZH* 1957, 8, 257. — 8. Ziemińska S., Haman S., Maleszewska J.: Metodyka bakteriologicznego badania wody i ścieków. Wydawn. Metod. PZH 1971, Nr 3, 38. — 9. Ziemińska S., Maleszewska J., Miłkowska-Jankowska D.: Paciorkowce kałowe jako wskaźniki zanieczyszczenia kałowego wody. Cz. I. Ilościowe bada-

nia porównawcze nad występowaniem bakterii grupy coli i paciorkowców kałowych w kale ludzkim. Roczn. PZH, 1976, 27, 133. — 10. Ziemińska S., Maleszewska J., Haman S., Miłkowska-Jankowska D.: Paciorkowce kałowe jako wskaźniki zanieczyszczenia kałowego wody. Cz. II. Występowanie paciorkowców kałowych w ściekach miejskich w porównaniu z bakteriami grupy coli. Roczn. PZH, 1980, 31, 191.

11. Ziemińska S., Haman S., Miłkowska-Jankowska D., Maleszewska J.: Paciorkowce kałowe, jako wskaźniki zanieczyszczenia kałowego wody. Cz. III. Występowanie paciorkowców kałowych, bakterii grupy coli i bakterii grupy coli typu kałowego w wodzie. Roczn. PZH, 1980, 31, 519.

Dn. 15.V.1980 r.

00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24