

Flora bakteryjna piaskownic dziecięcych z terenu aglomeracji miejskiej

TOMASZ HAUSCHILD, JOLANTA KACHNIARZ, JAN BUCZEK

Zakład Mikrobiologii Instytutu Biologii Wydziału Biologiczno-Chemicznego Uniwersytetu w Białymstoku,
ul. Świerkowa 20B, 15-950 Białystok

Hauschild T., Kachniarz J., Buczek J.

Bacteria isolated from sandboxes in the city

Summary

Selected sandboxes partially accessible to animals and located in different places in the city underwent bacteriological examination. As a result enteric bacteria belonging to the Enterobacteriaceae family (50 strains), among which 6 strains were of *Salmonella* sp., as well as bacteria of *Staphylococcus* genus (16 strains) were isolated. Consequently it is advisable to keep a stricter sanitary control over those sites, as they may pose a contamination threat for children.

Keywords: city, sandboxes, salmonella, staphylococcus

Autochtoniczna mikroflora i mikrofauna środowiska wykazująca swoistą aktywność nie sprzyja dłuższemu przeżywaniu w glebie bakterii chorobotwórczych. Zawsze jednak istnieje prawdopodobieństwo, że wniesione do gleby (wraz z odchodami ludzi i zwierząt) bakterie jelitowe oraz inne patogeny, mogą w pewnych warunkach przetrwać, a nawet rozmnażać się w tym środowisku (10). W piśmiennictwie można znaleźć szereg prac traktujących o glebie jako drodze w szerzeniu się epidemii chorób jelitowych. Na niebezpieczeństwo tego rodzaju zakażeń zwracało uwagę wielu autorów (4, 8, 10, 16, 17).

W badaniach dotyczących okresu utrzymywania się w glebie niektórych zarazków chorobotwórczych np. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serowar *Enteritidis* wykazywano dłuższy czas jej przeżywania w glebach organicznych (np. murszowej). Jest to związane ze strukturą tych gleb (duże przestrzenie międzykapilarnie, zwiększone wiązanie wody, obecność znacznej ilości koloidów), które stwarzają korzystne warunki dla życia mikroorganizmów. W glebach mineralnych (pseudobielice, mady piaszczyste) patogenne bakterie jelitowe znajdują warunki głodowe (11, 12). Mikroorganizmy chorobotwórcze jak np. *S. Enteritidis*, utrzymują się w glebie (zależnie od szczepu) średnio 16 dni. W przypadku zmiennej wilgotności 42-49 dni, przy stałej wilgotności 50-90 dni, w glebie zasilanej nawozem organicznym szczep *S. Typhimurium* przeżywał do 180 dni. Badania wskazują zatem, że w tym okresie, gleba jako nosiciel patogennych zarazków może stanowić potencjalne zagrożenie dla zdrowia człowieka i zwierząt (9, 10).

Inną grupą bakterii, której nosicielami są ludzie oraz zwierzęta, są obecne także w glebie i wodzie, są gron-

kowce (rodzaj *Staphylococcus*). Bakterie te stanowią istotne i coraz większe zagrożenie dla zdrowia człowieka. Obecnie rozpoznano 41 gatunków i podgatunków gronkowców (1, 19), z których wiele występuje u ludzi jako naturalna mikroflora skóry, gruczołów skórnych i błon śluzowych, inne są groźnymi patogenami (6, 7, 14). Zmiany chorobotwórcze w organizmie gospodarza zależą od inwazyjności szczepu – tj. zdolności przenikania przez bariery obronne organizmu i rozprzestrzeniania się w nim oraz do ilości i jakości wytwarzanych enzymów oraz toksyn, które w przebiegu zakażenia wywołują różne objawy kliniczne (18). W przebiegu zakażeń gronkowcowych opisywano zmiany skórne, zakażenia układu oddechowego, moczowego, przewodu pokarmowego, zatrucia pokarmowe, posocznice, zapalenie ropne: szpiku i kości, opon mózgowo-rdzeniowych, stawów, gruczołu mlekowego, zespół wstrząsu toksycznego (TSS-toxic shock syndrome) (5, 15).

Celem badań własnych było poznanie i scharakteryzowanie flory bakteryjnej wybranych piaskownic dziecięcych z terenu miasta „B”. Badania ukierunkowano przede wszystkim na wykrycie pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae* (rodzaj *Salmonella*) oraz gronkowców. Ocena stanu sanitarnego piaskownic może mieć znaczenie dla rozpoznania tego środowiska jako potencjalnego źródła patogennych zarazków niebezpiecznych dla małych użytkowników – dzieci.

Material i metody

Materiał do badań bakteriologicznych stanowił piasek z pięciu piaskownic dziecięcych znajdujących się na terenie miasta. Do porównań wybrano piaskownice typowe różniące się jednak między sobą specyficznymi cechami:

A – piaskownica w nowym osiedlu mieszkaniowym, zlokalizowana w miejscu zacienionym, dostępna dla zwierząt domowych (psy, koty),

B – piaskownica w nowym osiedlu, stanowisko nasłonecznione, z możliwym dostępem dla zwierząt domowych,

C – piaskownica typowa dla starszych osiedli mieszkaniowych, stanowisko zacienione, z możliwym dostępem dla zwierząt domowych,

D – piaskownica znajdująca się na terenie parku, odznaczająca się nieograniczonym dostępem dla zwierząt domowych (bezdomych psów i kotów) oraz zwierząt dziko żyjących,

E – piaskownica przydomowa, charakteryzująca się bardzo ograniczonym dostępem dla zwierząt.

Piasek pobierano z wierzchniej warstwy (do około 20 cm głębokości) jednorazowo w miesiącu V, VI, VII i IX 2000 r., to jest w okresie częstych zabaw dzieci w piaskownicach.

Odważone (10 g) próbki piasku eluowano 90 ml jałowej wody destylowanej. Zawiesinę rozcieńczano płynem fizjologicznym w stosunku: 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10 000. Tak przygotowane próby stanowiły bezpośredni materiał do posiewów bakteriologicznych. Kolejne rozcieńczenia zawiesin wysiewano (w ilości po 0,1 ml) na dwa podłoża: agarowe wzbogacone krwią i z dodatkiem 6,5% oraz 10% NaCl (jako podłoże wybiórcze dla gronkowców). Materiał rozprowadzano na powierzchni podłoża i inkubowano w temperaturze 37°C przez 48 h w warunkach tlenowych oraz w temperaturze pokojowej przez 48 h. Wyrosłe kolonie różnicowano na podstawie cech morfologicznych (wielkości, kształtu, barwy, przejrzystości, wyglądu brzegów) i liczono z uwzględnieniem typu morfologicznego.

Dla uzyskania jednorodnych, „czystych” hodowli wybrane jako „typowe” kolonie bakterii charakterystyczne dla rodziny *Enterobacteriaceae* i gronkowców przesiewano na podłoża agarowe i przechowywano w temperaturze ok. 4°C. Tak zabezpieczone izolaty stanowiły materiał wyjściowy do badań mających na celu identyfikację wyosobnionych szczepów. W tym przypadku wykorzystano rutynowe metody badań bakteriologicznych (morfologia, barwienie metodą Grama, wzrost na podłożach i wygląd kolonii, próby biochemiczne dla różnicowania cech w obrębie rodziny *Enterobacteriaceae* – pałeczki Gram-ujemne oraz rodzaju *Staphylococcus* – Gram-dodatnie ziarniaki). Pałeczki jelitowe (*Enterobacteriaceae*), które w badaniach biochemicznych odpowiadały cechom rodzaju *Salmonella* identyfikowano przy pomocy surowicy HM (metoda aglutynacji szkiełkowej, wobec *S. Enteritidis* i *S. Anatum* – jako kontroli).

Wyosobnione szczepy gronkowców określono i różnicowano na podstawie: wzrostu na podłożu agarowym z dodatkiem 6,5% i 10% NaCl, zdolności rozkładu mannitolu (podłoże Chapmana), wzrostu na podłożu z mocznikiem, rozkładu cukrów: glukozy, laktozy, sacharozy, fruktozy, galaktozy, ksylozy, rybozy, trehalozy, rafinozy, cellobiozy, maltozy, arabinozy, sorbitolu, rozkładu DNA (ocena obecności enzymu DN-azy), rozkładu azotanów, hemolizy krwinek (podłoże z dodatkiem 5% krwi baraniej). Cechę biochemiczną każdego szczepu oceniono oznaczając jako 1 – dodatni wynik próby, natomiast wynik ujemny – jako 0.

Porównanie cech przeprowadzono za pomocą współczynnika Simple matching (S_{SM}) (13). W metodzie tej im bardziej wartość współczynnika S_{SM} dla dwóch porównywanych szczepów zbliża się do 1, tym są one do siebie bardziej podobne pod względem cech biochemicznych. Współczynnik S_{SM} umożliwił sporządzenie macierzy zgodności szczepów, na podstawie której (metodą UPGMA) wykonano dendrogram (ryc. 1) obrazujący podział i zróżnicowanie badanych szczepów gronkowców.

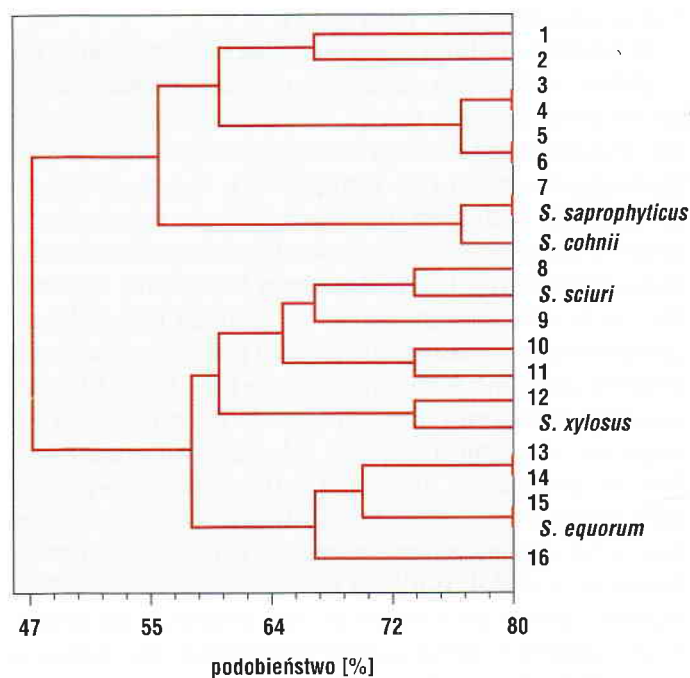
Wyniki i omówienie

Analizę jakościową i ilościową flory bakteryjnej wyosobnionej z pięciu wybranych piaskownic przedstawiono w tab. 1, a jej procentowy skład z wszystkich piaskownic w tab. 2.

Wśród izolatów, które w badaniach morfologicznych i biochemicznych oznaczano jako Gram-ujemne pałeczki rodziny *Enterobacteriaceae* (50 szczepów), 6 szczepów na podstawie charakterystycznego antygenu rzęskowego H zdiagnozowano jako *Salmonella* (bez oznaczania gatunku i serowaru). Te patogenne i potencjalnie patogenne dla człowieka i zwierząt bakterie wyosobniono z piaskownicy A i C (po jednym szczepie) oraz z piaskownicy D (4 szczepy). Biorąc pod uwagę okres pobrania materiału trzy szczepy wyosobniono z drugiego pobrania (miesiąc czerwiec) materiału z piaskownicy D, natomiast trzy z trzeciego pobrania (miesiąc lipiec) materiału z piaskownic A, C i D.

Spośród wyosobnionych Gram-dodatnich ziarniaków 16 zidentyfikowano jako *Staphylococcus* sp., ich charakterystykę biochemiczną przedstawia tabela 3, a zróżnicowanie dendrogram (ryc. 1).

Na podstawie zdolności do wykorzystania testowego substratu, w uformowanym metodą UPGMA den-



Ryc. 1. Zróżnicowanie gronkowców wyizolowanych z piaskownic dziecięcych

Tab. 1. Liczba izolatów w grupach bakterii wyosobnionych z piaskownic dla poszczególnych próbek

Piaskownica A – grupa bakterii	Miesiąc				Razem
	V	VI	VII	IX	
Ziarniaki	5	12	12	10	49
Laseczki	3	2	2	2	9
Pałeczki <i>Enterobacteriaceae</i>	0	0	1	3	4
Pałeczki nie- <i>Enterobacteriaceae</i>	0	0	1	0	1
Gronkowce	0	0	0	0	0
Razem	8	14	16	15	63
Piaskownica B – grupa bakterii	Miesiąc				Razem
	V	VI	VII	IX	
Ziarniaki	20	14	15	7	56
Laseczki	–	5	4	4	13
Pałeczki <i>Enterobacteriaceae</i>	–	1	3	1	5
Pałeczki nie- <i>Enterobacteriaceae</i>	2	–	2	1	5
Gronkowce	5	–	1	–	6
Razem	27	20	25	13	85
Piaskownica C – grupa bakterii	Miesiąc				Razem
	V	VI	VII	IX	
Ziarniaki	10	22	24	10	66
Laseczki	–	3	5	3	11
Pałeczki <i>Enterobacteriaceae</i>	1	5	4	2	12
Pałeczki nie- <i>Enterobacteriaceae</i>	–	2	2	–	4
Gronkowce	2	1	–	–	3
Razem	13	33	35	15	96
Piaskownica D – grupa bakterii	Miesiąc				Razem
	V	VI	VII	IX	
Ziarniaki	9	12	16	4	41
Laseczki	6	9	5	2	22
Pałeczki <i>Enterobacteriaceae</i>	4	7	6	–	17
Pałeczki nie- <i>Enterobacteriaceae</i>	3	6	2	1	12
Gronkowce	3	–	1	–	4
Razem	25	34	30	7	96
Piaskownica E – grupa bakterii	Miesiąc				Razem
	V	IV	VII	IX	
Ziarniaki	11	14	11	8	44
Laseczki	4	10	5	2	21
Pałeczki <i>Enterobacteriaceae</i>	2	4	5	1	12
Pałeczki nie- <i>Enterobacteriaceae</i>	1	4	2	4	11
Gronkowce	2	–	1	–	3
Razem	20	32	24	15	91

drogramie, wyróżnia się dwie grupy – klastery wyosobnionych gronkowców. Klaster I obejmuje 9 szczepów w tym: *Staphylococcus saprophyticus*, *S. cohnii*, które jako szczepy „wzorcowe” wprowadzono do porów-

Tab. 2. Procentowy skład grup bakterii wyosobnionych ze wszystkich próbek i piaskownic

Grupa bakterii	Procentowy udział
Ziarniaki	58,8
Laseczki	17,7
Pałeczki <i>Enterobacteriaceae</i>	13,4
Pałeczki nie- <i>Enterobacteriaceae</i>	6,8
Gronkowce	3,3

Tab. 3. Całkowita liczba (16) badanych gronkowców oraz liczba i % szczepów aktywnych w stosunku do substratu

Rodzaj substratu	Liczba i % szczepów reagujących dodatnio	
Glukoza	12	75
Laktoza	8	50
Sacharoza	10	62,5
Fruktoza	11	68,75
Galaktoza	5	31,25
Ksyloza	6	37,5
Ryboza	6	37,5
Trehaloza	4	25
Rafinoza	6	37,5
Cellobioza	4	25
Maltoza	2	12,5
Arabinoza	4	25
Sorbitol	6	37,5
Azotany	10	62,5
DNA	0	0
Mocznik	3	18,75
Hemoliza	8	50

nia. Klaster II obejmuje 12 szczepów w tym: *Staphylococcus sciuri*, *S. xylosus* i *S. equorum* jako szczepy „wzorcowe”. W wydzielonych klasternach, biorąc za podstawę wartości współczynnika $S_{SM} = 0,648$ można wyróżnić mniejsze jednostki – podklastery. Klaster I obejmuje trzy podklastery: A_1 – 2 szczepy, B_1 – 4 szczepy, C_1 – 3 szczepy, a klaster II również trzy podklastery: A_2 – 5 szczepów, B_2 – 2 szczepy, C_2

– 5 szczepów, co wskazuje na duże zróżnicowanie wyosobnionych z piaskownic szczepów gronkowców.

W dużych aglomeracjach miejskich nieogrodzone tereny zabaw dla dzieci oraz trawniki stanowią także dla zwierząt (głównie psów, kotów) częste miejsce wybiegu i pozostawiania odchodów. Tym samym miejsce te, jako rezerwuar wielu bakterii oraz pasożytów, mogą stanowić źródło zakażenia i przyczynę groźnych chorób, szczególnie dzieci. W odniesieniu do zanieczyszczeń parazytologicznych piaskownic, badania przeprowadzone w ostatnich latach potwierdzają potencjalne zagrożenie możliwością zaistnienia tej drogi inwazji, szczególnie wywołanej przez *Toxocara canis* (2, 3). Badania własne dotyczące tlenowej i mikroaerofilnej flory bakteryjnej występującej w piaskownicach wskazują także (tab. 1 i 2) na obecność licznej i zróżnicowanej mikroflory bakterii tlenowych i mikroaerofilnych. Rozpoznanie ukierunkowane na obecność przedstawicieli tlenowej i mikroaerofilnej flory bakteryjnej, której naturalną niszą ekologiczną jest przewód pokarmowy wielu gatunków ssaków (*Enterobacteriaceae*) oraz gronkowców, potwierdza przypuszczenie o możliwości występowania bakterii o zróżnicowanych cechach patogenności dla człowieka i zwierząt. Obecność dość licznej grupy pałeczek jelitowych (50 izolatów), w tym 6 należących do rodzaju *Salmonella* oraz 16 gronkowców (o zróżnicowanej przynależności do gatunku – dendrogram ryc. 1) wskazuje na zanieczyszczenie tych środowisk. Wydaje się, że zarówno lokalizacja piaskownic, a co za tym idzie i ich dostępność dla zwierząt oraz częstość wymiany piasku nie pozostaje bez znaczenia dla składu mikroflory, w tym bakteryjnej, tego specyficznego środowiska. Nasuwa się zatem uzasadnione spostrzeżenie o konieczności objęcia większą troską niezbędnych, w każdej aglomeracji miejskiej, miejsc zabaw dzieci oraz przyjęcia pewnych reżimów kontroli i oceny sanitarnej piaskownic dziecięcych na wzór kąpielisk. Piaskownice jako teren zabaw dzieci, stanowią rezerwuar także patogennych zarazków i potencjalne źródło zakażenia, a zatem winny być objęte należytym nadzorem sanitarnym.

Piśmiennictwo

1. *Euzebey J.P.*: List of bacterial names with standing in nomenclature (<http://www-sv.cict.fr/bacterio/s/staphylococcus.html>), 2001.
2. *Gundlach J.L., Sadzikowski A.B., Tomczuk K.*: Zanieczyszczenie jajami *Toxocara* sp. wybranych środowisk miejskich i wiejskich. *Medycyna Wet.* 1996a, 52, 395-396.
3. *Gundlach J.L., Sadzikowski A.B., Tomczuk K.*: Występowanie przeciwciał anty *Toxocara canis* w surowicach ludzi. *Medycyna Wet.* 1996b, 52, 516-517.
4. *Harris J.R.*: Clinical and epidemiological characteristics of common infections diseases and chemical poisonings caused by ingestion of contaminated drinking water. W: *Waterborne Diseases in the United States*. Red.: Craun G. CRC Press, Boca Raton, Florida, 1986, s.11-22.
5. *Jarvis W.R., Martone W.J.*: Predominant pathogens in hospital infections. *J. Antimicrob. Chemother.* (Suppl. A) 1992, 29, 19-24.
6. *Kloos W.E., Bannerman T.L.*: Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *Clin. Microb. Rev.* 1994, 7, 117-140.
7. *Kloos W.E., Bannerman T.L.*: *Staphylococcus and micrococcus*. W: *Manual of clinical microbiology*, wyd. 7. Red: P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover, R.C. Tenover. American Society for Microbiology, Washington, D. C. 1999, s. 264-282.
8. *Krishnaswami S.K.*: Health aspect of land disposal of municipal wastewater effluents. *Canad. J. Publ. Hlth* 1971, 62, 36-41.
9. *Mawdsley J.L., Bardgett R.D., Merry R.J., Pain B.F., Theodorou M.K.*: Pathogens in livestock waste, their potential for movement through soil and environmental pollution. *Appl. Soil Ecol.* 1995, 2, 1-15.
10. *Milkowska-Jankowska D.*: Przeżywalność wybranych chorobotwórczych bakterii w różnych typach gleb. *Roczn. PZH*, 1971, XXII, 657-664.
11. *Milkowska-Jankowska D.*: Wpływ rodzaju gleby i sposobu nawożenia organicznego na przeżywalność jelitowych bakterii chorobotwórczych. *Roczn. PZH*, 1974, XXV, 529-539.
12. *Paluszak Z.*: Badania nad zachowaniem i przeżywalnością wybranych drobnoustrojów fekalnych w glebie nawożonej gnojowicą. *Wyd. AT-R w Bydgoszczy*, 1998.
13. *Priest F.G., Austin B.*: *Modern Bacterial Taxonomy*. Chapman and Hall, London 1993.
14. *Różalska B., Burów A., Pachelska M., Rudnicka W.*: Udział gronkowców koagulazoujemnych (CNS) w zakażeniach. *Post. Mikrobiol.* 1995, XXXIV, 453-469.
15. *Rupp M.E., Archer G.L.*: Coagulase-negative staphylococci: pathogens associated with medical progress. *Clin. Infect. Dis.* 1994, 19, 231-245.
16. *Schindler P.R.*: Nachweis von *Yersinia enterocolitica* aus Trinkwasser- versorgungsanlagen in Südbayern. *Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. B*, 1984, 180, 76-84.
17. *Sorber C.A., Moore B.E.*: Survival and transport of pathogens in sludge amended soil, a critical literature review. Report EPA/600/2-87/028 of Water Res. Lab., Office Res. Develop., Cincinnati, Ohio, 1987.
18. *Szymańska K., Buczek J.*: Charakterystyka mechanizmów chorobotwórczości gronkowców. *Medycyna Wet.* 1999, 55, 590-594.
19. *Vernozzy-Rozand C., Mazuy C., Meugnier H., Bes M., Lasne Y., Fiedler F., Etienne J., Freney J.*: *Staphylococcus fleuretii* sp. nov., isolated from goat's milk cheeses. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2000, 50, 1521-1527.

Adres autora: dr Tomasz Hauschild, ul. Świerkowa 20B, 15-950 Białystok, e-mail: thausch@noc.uwb.edu.pl

HUEBNER J., BODE L., LUDWIG H.: Zakażenie wirusem choroby bornajskiej kotów reagujących dodatnio na FIV w Niemczech. (Borna disease virus infection in FIV-positive cats in Germany). *Vet. Rec.* 149, 152, 2001 (5)

Wirus choroby bornajskiej (BDV) wywołuje u kotów zespół objawów określanych jako „choroba zataczania się”. Częstość zakażeń wirusem BDV w populacji kotów waha się od 8,4% do 23%, a u kotów z objawami neurologicznymi może dochodzić do 30%. Celem badań było określenie częstości występowania zakażeń wirusem BDV w populacji kotów reagujących pozytywnie na wirus niedoboru immunologicznego (FIV). Przebadano w teście ELISA na obecność przeciwciał dla wirusa BDV surowice 186 kotów nie reagujących z wirusem FIV oraz surowice 68 kotów seropozytywnych. Przeciwciała dla wirusa choroby bornajskiej występowały w surowicach 17,2% kotów nie posiadających przeciwciał dla wirusa FIV i w surowicach 33,8% kotów posiadających w surowicy przeciwciała dla wirusa FIV.

DAVIES R., BRESLIN M.: Zanieczyszczenie środowiska i wykrycie *Salmonella enterica* serovar *enteritidis* w stadach kur niosek. (Environmental contamination and detection of *Salmonella enterica* serovar *enteritidis* in laying flocks). *Vet. Rec.* 149, 699-704, 2001 (23)

Przeprowadzono monitoring w stadach kur niosek w celu opracowania najbardziej przydatnego w praktyce programu wykrywania zakażeń wywołanych przez drobnoustroje z rodzaju *Salmonella*. W 14 stadach stosowano chów klatkowy, w 10 halowy, w 7 stadach kury korzystały z wybiegów. Do izolacji salmoneli wykorzystano kał, ściółkę, podłoże, odpadki, urządzenia służące do zbioru jaj. Częstość zakażenia salmonelami zależała od szczepienia stad i od typu chowu. Często salmonelle izolowano z urządzeń służących do zbioru jaj. Salmonelle wykryto także w organizmie padłych myszy, ptaków i w kale tych zwierząt.