

Przeżywalność *Campylobacter coli* w gnojowicy składowanej w różnych temperaturach

ZBIGNIEW PALUSZAK, HALINA OLSZEWSKA*

Katedra Mikrobiologii Wydziału Rolniczego AT-R, ul. Bernardyńska 6/8, 85-029 Bydgoszcz

*Katedra Higieny Zwierząt i Mikrobiologii Środowiska Wydziału Zootechnicznego AT-R, ul. Mazowiecka 28, 85-084 Bydgoszcz

Paluszak Z., Olszewska H.

The survival of *Campylobacter coli* in slurry stored at different temperatures

Summary

The influence of storage temperature on *Campylobacter coli* in contaminated slurry was investigated. As a consequence of the temperature the survival time of *Campylobacter coli* in swine slurry stored at 4°C, 10°C, 37°C and 55°C ranged from 26.8 minutes to 146.4 days. The decimal reduction times (T_{90}) varied from 4.29 minutes to 17.6 days respectively. The recommended storage time (by EU) seems to be too short to destroy all pathogens present in slurry. Particular attention should be directed to the control investigations of slurry storage before spreading it out in the environment.

Keywords: *Campylobacter coli*, slurry, environment

Drobnoustroje z rodzaju *Campylobacter* występują u zwierząt dzikich i domowych, powszechnie uważane są za rezerwuuar schorzeń u ludzi. Wiele badań poświęcono źródłom zakażeń, za które uważa się mięso drobiowe, surowe mleko, wołowinę, wodę pitną i inne (5, 7). Zdecydowanie mniej publikacji dotyczy przeżywalności termofilnych *Campylobacter coli* w gnojowicy stosowanej jako nawóz na pola lub pastwiska, choć tą drogą duża liczba tych bakterii przenoszona jest do środowiska. Dane piśmiennictwa na temat wrażliwości bakterii z rodzaju *Campylobacter* na warunki środowiska są rozbieżne (4, 6, 12, 17, 20). Mimo, że uchodzą one za stosunkowo wrażliwe na czynniki środowiska zewnętrznego, w pewnych warunkach stanowią zagrożenie dla wypasanych zwierząt. Złóżka gnojowicy nie poddanej higienizacji utrudniają samooczyszczanie gleby i prowadzić może do skażenia wód gruntowych i powierzchniowych (10, 24).

Celem badań było określenie wpływu temperatury na przeżywalność w gnojowicy *Campylobacter coli*.

Materiał i metody

Gnojowicę do badań pobierano ze zbiornika uśredniającego, gromadzącego odchody pochodzące od świń. Do 10 litrów gnojowicy dodawano zawiesinę *Campylobacter coli* uzyskaną poprzez spłukanie wyrosniętych ze szczepu testowego kolonii bakteryjnych na agarze Columbia z dodatkiem 5% krwi baraniej oraz antybiotyków (5 mg/l trimethoprim, 10 mg/l wankomycyny i 2,5 mg/l polimyksyny). Po dokładnym wymieszaniu liczba bakterii w gnojowicy wahała się w zakresie 10^7 - 10^9 jtk/ml. Następnie przenoszono po 2,5 l zanieczyszczonej bakteriami gnojowicy do osobnych pojemników, które przechowywano w temperaturze: 4, 10, 37 i 55°C. Próbkę gnojowicy do badań objęto-

ści 1 i 10 ml pobierano w różnych odstępach czasu oznaczając liczbę bakterii metodą NPL, stosując odpowiednio 9 i 90 ml bulionu namnażającego wg Prestona z dodatkiem 5% krwi baraniej, antybiotyków (5 mg/l trimethoprim, 10 mg/l wankomycyny i 2,5 mg/l polimyksyny) oraz suplementu (125 mg/l siarczanu sodu, siarczanu żelaza i pirogronianu sodowego). Po 24 godzinach inkubacji w temperaturze 42°C i dokładnym wymieszaniu pobierano kilka kropeł bulionu przenosząc je na filtr membranowy (0,45 µm) umieszczony na agarze Columbia z dodatkiem krwi końskiej, antybiotyków i suplementu. Po 1 godzinie filtr zdejmowano, a podłoże inkubowano w warunkach mikroaerofilnych w temp. 42°C przez 24 godziny. Identyfikację drobnoustrojów oparto na obserwacji ich ruchliwości pod mikroskopem, ponadto wykonano test na oksydazę i katalazę.

Uzyskane wyniki liczebności populacji przedstawiono w postaci logarytmu (\log_{10}) i wykreślono proste regresji charakteryzujące inaktywację bakterii w gnojowicy w czasie, w poszczególnych temperaturach jej składowania. Równania regresji ustalono wg wzoru: $y = ax + b$, w którym y – liczba drobnoustrojów w postaci \log_{10} ; a – współczynnik kierunkowy odpowiadający średniej zmianie liczby bakterii w postaci log na minutę lub dzień; x – czas w minutach lub dniach; b – teoretyczna liczba bakterii w początkowej fazie doświadczenia. Za czas przeżywalności przyjęto umownie okres, po którym w badanej próbce gnojowicy znajdowała się jedna bakteria ($\log 1 = 0$).

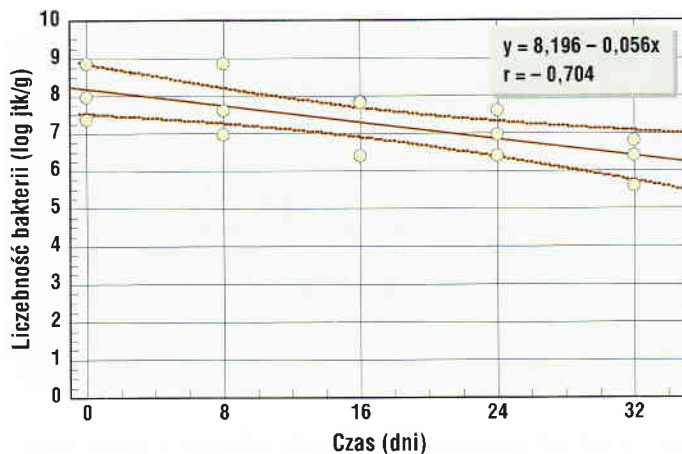
Na podstawie równań regresji wyliczono wartość D określającą czas niezbędny dla redukcji populacji badanych bakterii o 90%.

Wyniki i omówienie

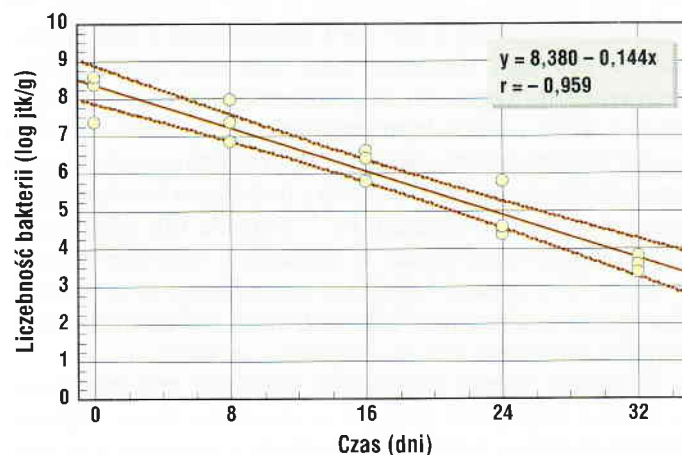
Uzyskane wyniki przedstawiono w tab. 1 i na ryc. 1-4. Z przeprowadzonych badań wynika, że tempo inaktywacji *C. coli* w gnojowicy było wyraźnie zróżnicowane i zależało od temperatury jej składowania.

Tab. 1. Parametry statystyczne charakteryzujące inaktywację *C. coli* w badanej gnojowicy

Temperatura	r	a	D	Przeżywalność
4°C	-0,705	-0,056	17,6 dni	146,4 d
10°C	-0,958	-0,144	7,04 dni	58,3 d
37°C	-0,977	-0,933	1,06 dni	8,3 d
55°C	-0,908	-0,233	4,29 min	26,8 min

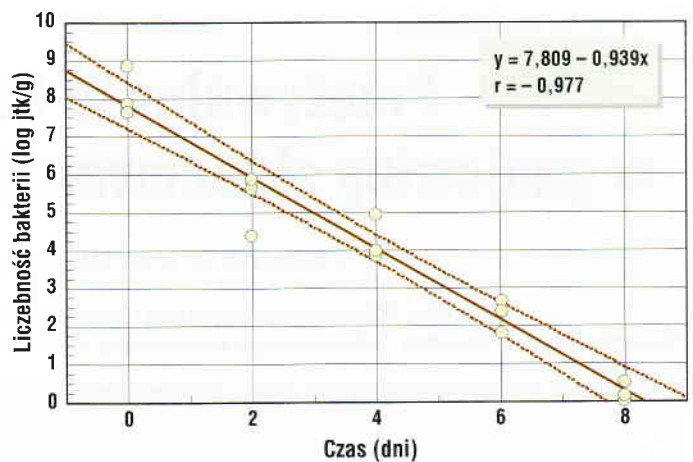


Ryc. 1. Inaktywacja *Campylobacter coli* w gnojowicy przechowywanej w 4°C

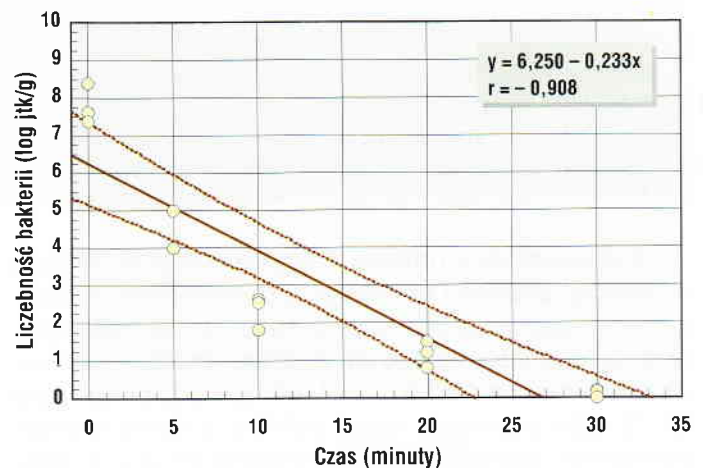


Ryc. 2. Inaktywacja *Campylobacter coli* w gnojowicy przechowywanej w 10°C

Najwolniej liczebność populacji *C. coli* zmniejszyła się w gnojowicy przechowywanej w temperaturze 4°C. Przeżywalność drobnoustrojów wyliczona na podstawie prostej regresji wyniosła 146 dni, a czas niezbędny dla redukcji liczby populacji o 90% wyniósł 17,6 dni. Również w gnojowicy przechowywanej w temperaturze 10°C bakterie te zachowywały żywotność stosunkowo długo. Dzienny ubytek liczebności populacji wyniósł 0,144 log, a czas przeżywalności zmniejszył się do 58 dni. W zakresie temperatur mezofilnych i termofilnych następowało gwałtowne pogorszenie warunków życiowych dla badanych bakterii w gnojowicy. Wartość D w temperaturze 37°C spadła do 1,06 dni i była mniejsza w stosunku do wyliczonych dla temperatury 4°C i 10°C odpowiednio o 16 i 6 dni. W 8



Ryc. 3. Inaktywacja *Campylobacter coli* w gnojowicy przechowywanej w 37°C



Ryc. 4. Inaktywacja *Campylobacter coli* w gnojowicy przechowywanej w 55°C

dniu doświadczenia izolowano niewielką liczbę badanych drobnoustrojów. Najszybciej obumierały bakterie z rodzaju *Campylobacter* w temperaturze 55°C. Po 30 minutach nastąpiła pełna inaktywacja *Campylobacter* w gnojowicy. Wartość D wyliczona dla temperatury 55°C wyniosła 4,13 minut, a liczebność populacji wyrażona w postaci log zmniejszała się z każdą minutą o 0,233 log. Wyniki badań świadczą jednoznacznie, że temperatura składowania gnojowicy jest jednym z podstawowych czynników wpływających na tempo eliminacji drobnoustrojów *Campylobacter*, a tym samym wpływa bezpośrednio na bezpieczeństwo środowiska.

Dane piśmiennictwa potwierdzają fakt częstego występowania bakterii z rodzaju *Campylobacter* w płynnych i stałych odchodach zwierzęcych (19). W zależności od geograficznej lokalizacji odsetek był, w którego odchodach izoluje się bakterie *Campylobacter sp.* waha się od 0 nawet do 100% (18, 24). Busato (2) badając 1521 próbek kału pochodzącego od 395 cieląt, stwierdził obecność *C. jejuni* w 38,5%, *C. coli* w 3,4%, a *C. fetus* w 15,5%. Za rezerwuara *C. coli* uważana jest populacja świń, stąd też należy liczyć się z jego częstym występowaniem w gnojowicy z ferm trzody chlewnej. Bakterie te są mniej niebezpieczne i

rzadziej wywołują schorzenia u ludzi w porównaniu do *C. jejuni* (18). W celu zapobiegania rozprzestrzenianiu się drobnoustrojów w środowisku gnojowicy powinno podawać się procesom uzdatniania. W naszych warunkach najczęściej spotykaną formą higienizacji gnojowicy jest jej składowanie w specjalnych zbiornikach otwartych lub zamkniętych, przed użyciem w celach nawozowych. Procesy napowietrzania w warunkach mezo i termofilnych stosowane są bardzo rzadko. W procesie składowania gnojowicy liczba zawartych w niej patogenów ulega stopniowemu zmniejszeniu. Tempo inaktywacji drobnoustrojów patogennych jest różne i zależy od rodzaju i liczby drobnoustrojów, pH, temperatury gnojowicy i czasu składowania (22). Wartość D (T_{90}), określająca czas spadku liczby populacji o 90%, dla bakterii w gnojowicy jest dość zróżnicowana i wyraźnie uzależniona od rodzaju drobnoustrojów i jej temperatury. Z badań Kearney i wsp. (9) wynika, że dla *Y. Enterocolitica* w gnojowicy w 4°C wartość D wynosi 20,8 dni, a w temperaturze 17°C spada do 12,8 dni. Szybciej eliminowane są pałeczki *Salmonella*, dla których wartość D wynosi odpowiednio 21,3 dni i 17,5 dni, wolniej natomiast *L. monocytogenes* odpowiednio > 84 dni i 29,4 dni. W badaniach własnych przeżywalność *Campylobacter coli* była bardzo zróżnicowana i uzależniona od temperatury przechowywania gnojowicy. Szczególnie w niskich temperaturach otoczenia izolowano *Campylobacter coli* w badanych próbkach przez długi okres czasu. W zakresie temperatur psychrofilnych okres przeżywalności wahał się od 50 do 166 dni, a czas spadku liczebności populacji o 90% wynosił od 7 do 17,6 dni (tab. 1).

Uzyskane wartości odbiegały dość znacznie od otrzymanych przez autorów we wcześniejszych eksperymentach. W gnojowicy bydłowej dla *C. jejuni* wartość D wynosiła 4,52 dni, a ich przeżywalność określono na okres 41 dni (15). Z kolei inne badania dowodzą, że *Campylobacter sp.* w gnojowicy przechowywanej w niskich temperaturach może przeżywać przez o wiele dłuższy czas niż uzyskany w przeprowadzonych obserwacjach (9). Wyliczone wartości D przewyższały bowiem okres 112 dni. Fakt zachowania długotrwałej aktywności *Campylobacter sp.* w środowisku w niskich temperaturach potwierdzili również inni autorzy (3, 13, 21). Rollins i Colwell (17) izolowali je z wody o temperaturze 4°C przez okres 4 miesięcy. W środowisku wodnym obserwuje się sezonowe zmiany w zakresie intensywności występowania *Campylobacter sp.* (14), a obfite opady deszczu sprzyjają zanieczyszczeniu wód powierzchniowych poprzez wypłukiwanie ich ze ścieków odwierających (1, 8). Uzyskane wyniki dowodzą, że ustalony przez Unię Europejską okres składowania gnojowicy wynoszący co najmniej 2 miesiące przed jej wykorzystaniem do celów nawozowych, wydaje się być niewystarczający dla pełnej eliminacji z niej bakterii *Campylobacter sp.*, szczególnie w chłodnych porach roku.

Piśmiennictwo

- Bolton F. J., Coates D., Hutchinson D. N., Godfree A. F.: A study of thermophilic campylobacters in a river system. *J. Appl. Bacteriol.* 1987, 62, 167-176.
- Busato A., Hofer D., Lentze T., Gaillard C., Burnens A.: Prevalence and infection risks of zoonotic enteropathogenic bacteria in Swiss cow-calf farms. *Vet. Microbiol.* 1999, 69, 251-263.
- Buswell C. M., Herlihy Y. M., Lawrence L. M., McGuiggan J. T. M., Marsh P. D., Keevil C. W., Leach S. A.: Extended survival and persistence of *Campylobacter* spp. in water and aquatic biofilms and their detection by immunofluorescent-antibody and rRNA staining. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998, 64, 733-741.
- Burtscher C., Fall P. A., Christ O., Wilderer P. A. and Wuertz S.: Detection and survival of pathogens during two-stage thermophilic/mesophilic anaerobic treatment of suspended organic waste. *Wat. Sci. Tech.* 1998, 38, 123-126.
- Butzler J. P., Oostrom J.: *Campylobacter*: pathogenicity and significance in foods. *Int. J. Food Microbiol.* 1991, 12, 1-8.
- Doyle M. P., Roman D. J.: Sensitivity of *Campylobacter jejuni* to drying. *J. Food Prot.* 1982, 45, 507-510.
- Doyle M. P., Jones D. M.: Food-borne transmission and antibiotic resistance of *Campylobacter jejuni*. W: Nachamkin I., Blaser M. J. (Wyd.), *Campylobacter jejuni: Current Status and Future Trends*, Washington DC, ASM Press, 1992, s.45-48.
- Jones K., Betaieb M., Telford D. R.: Thermophilic campylobacters in surface waters around Lancaster, UK: negative correlation with campylobacter infections in the community. *J. Appl. Bacteriol.* 1990, 69, 758-764.
- Kearney T. E., Larkin M. J., Levelt P. N.: The effect of slurry storage and anaerobic digestion on survival of pathogenic bacteria. *Appl. Bacteriol.* 1993, 74, 86-93.
- Kluczek J. P., Kluczek B., Skinder Z.: Gnojowica a ryzyko skażenia środowiska rolniczego. I. Flora bakteryjna gleby i roślin pastewnych. *Pr. Kom. Nauk Rol. Biol. PWN, Warszawa-Poznań*, 1990, 28, 145-186.
- Knill M. J., Suckling W. G., Pearson A. D.: *Campylobacter* from water. W: *Campylobacter: Epidemiology Pathogenesis and Biochemistry*. Wyd. Newell D. G., Lancaster: MPT Press, 1982, s. 281-284.
- Norcross M. A., Johnston R. W., Brown J. L.: Importance of *Campylobacter* spp. to the food industry. W: Nachamkin I., Blaser M. J. (Wyd.), *Campylobacter jejuni: Current Status and Future Trends*, Washington DC, ASM Press, 1992, s.61-65.
- Obiri-Danso K., Jones K.: Intertidal sediments as reservoirs for hippurate negative campylobacters, Salmonellae and faecal indicators in three EU recognised bathing waters in north west England. *Wat. Res.* 1999, 34, 519-527.
- Obiri-Danso K., Jones K.: Distribution and seasonality of microbial indicators and thermophilic campylobacters in two freshwater bathing sites on the River Lune in north-west England. *J. Appl. Microbiol.* 1999, 87, 822-832.
- Paluszak Z., Olszewska H.: Einfluß der Temperatur auf die Überlebensfähigkeit von *Campylobacter jejuni* in gelagerter Rindergülle. *Tierärztl. Umschau* 2000, 48-55.
- Pickert A., Botzenhart K.: Überleben von *Campylobacter jejuni* im Trinkwasser, Flusswasser und Abwasser. *Zbl. Bakt. Hyg. B* 1985, 182, 49-57.
- Rollins D. M., Colwell R. R.: Viable but monoculturable stage of *Campylobacter jejuni* and its role in survival in the natural aquatic environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 1986, 52, 531-538.
- Rosef O., Gondrosen B., Kapperud G., Underdal B.: Insolation and characterization of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from domestic and wild mammals in Norway. *Appl. Environ.* 1983, 46, 855-859.
- Stanley K. N., Wallace J. S., Jones K.: Thermophilic campylobacters in dairy slurries on Lancashire farms: seasonal effects of storage and land application. *J. Appl. Microbiol.* 1998, 85, 405-409.
- Stelzer W., Jacob J., Schulze E., Mochmann H.: Untersuchungen zum Vorkommen und Überleben von *Campylobacter* im Klärschlamm. *Zentralbl. Mikrobiol.* 1991, 146, 17-23.
- Stelzer W., Jacob J.: A study of *Campylobacter* in sewage, sewage sludge and in river water. *Water Sci. and Technol.* 1991, 24, 117-120.
- Strauch D.: Zur Problematik der Gulleausbringung in Wasserschutzgebieten. *Forum Städte-Hygiene* 1990, 41, 126-132.
- Trachtler J.: Untersuchungen zum Verhalten von Gullekeimen im Boden-Einfluß der ausgebrachten Gullemenge und der Probenahmetechnik. Praca dyplomowa, Institut für Umwelt- und Tierhygiene sowie Tiermedizin mit Tierklinik, Universität Hohenheim 1991.
- Warner D. P., Bryner J. H., Beran G. W.: Epidemiologic study of campylobacteriosis in Iowa cattle and the possible role of unpasteurized milk as a vehicle of infection. *Am. J. Vet. Res.* 1986, 47, 254-258.