

# Przeżywalność pałeczek *Salmonella senftenberg* W<sub>775</sub> w osadach pościekowych poddanych procesowi kompostowania\*)

ZBIGNIEW PALUSZAK, JUSTYNA BAUZA-KASZEWSKA, ANNA LIGOCKA

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

Paluszak Z., Bauza-Kaszewska J., Ligocka A.

## Survival of *Salmonella senftenberg* W<sub>775</sub> in the sewage sludge composting process

### Summary

The aim of the investigation was to study *Salmonella senftenberg* W<sub>775</sub> inactivation in the sewage sludge composting process. Pouches filled with bacteria suspension (108-9 cfu/ml) were placed into three layers of a heap: in the center, on the top part and in its outer zone. The inactivation rate of *S. senftenberg* W<sub>775</sub> varied from 0.29 to 0.36 log/day in the center and top parts of the pile and from 0.07 to 0.08 log/day in the outer zone. The survival time calculated from the regression equation ranged from 26.4 to 121 days. The investigation demonstrates that the composting process of sewage sludge was insufficient and with its utilization in agriculture the spread of pathogens into the environment must be taken into account.

**Keywords:** *Salmonella*, compost, sewage sludge

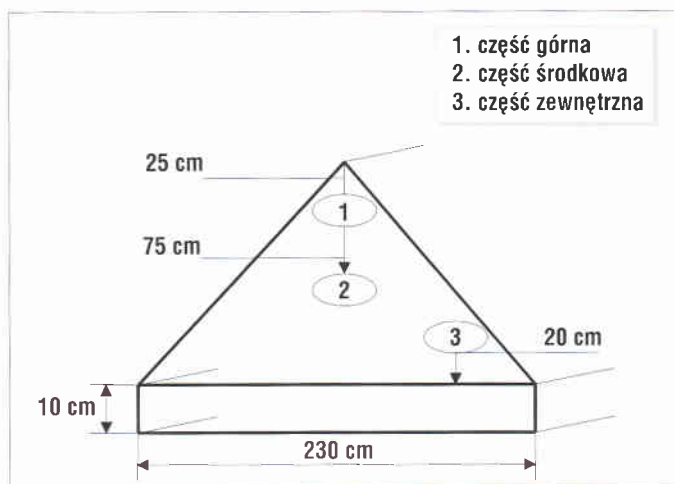
Ze względu na możliwość rozprzestrzeniania drobnoustrojów chorobotwórczych, racjonalne zagospodarowanie osadów pościekowych w rolnictwie stanowi bardzo ważny element biobezpieczeństwa środowiska (1, 19, 28). Fakt intensywnego zanieczyszczenia bakteriami patogennymi osadów pochodzących ze ścieków komunalnych i odzwierzęcych jest niekwestionowany. Spośród mikroorganizmów chorobotwórczych na szczególną uwagę zasługują pałeczki z rodzaju *Salmonella*, które tak pod względem zjadliwości, jak i oporności na czynniki środowiska należą do najbardziej niebezpiecznych (5, 8, 14, 15). Obecność dużej ilości substancji organicznych osadu może być dla tych bakterii doskonałą pożywką, stąd też w pewnych warunkach, mogą być one w nich bardzo długo aktywne (26). W celu ustabilizowania osadów stosuje się z różnym skutkiem procesy kompostowania, których głównym zadaniem jest, poza mineralizacją składników organicznych, likwidacja drobnoustrojów patogen-

Celem badań było określenie tempa inaktywacji pałeczek *Salmonella senftenberg* W<sub>775</sub> w kompostowanych osadach pościekowych. W oparciu o uzyskane wyniki w warunkach środowiskowych określono efektywność metody uzdatniania osadów pościekowych. Pozwoliło to na ocenę ryzyka sanitarno-epidemiologicznego wynikającego ze stosowania kompostowanych osadów jako nawozu w rolnictwie i roz-

przestrzeniania bakterii z rodzaju *Salmonella* w środowisku.

### Materiał i metody

Badanie inaktywacji pałeczek *S. senftenberg* W<sub>775</sub> w kompostowanych osadach przeprowadzono w kwietniu i maju 2002 r. (ok. 30 dni). Pryzmy kompostowe składały się z odwodnionych osadów uzyskanych ze ścieków komunalnych i rzeźnianych, oraz słomy i trocin w proporcjach 1 : 0,7 : 0,3 (pryzma – A) i 1 : 0,3 : 0,7 (pryzma – B). W części górnej, środkowej i zewnętrznej pryzm umieszczono nośniki zawierające po 1 ml zawiesiny pałeczek *S. senftenberg* W<sub>775</sub> o gęstości 10<sup>8-9</sup> jtk/ml (ryc. 1). Nośniki



Ryc. 1. Rozmieszczenie nośników zawierających pałeczki *Salmonella senftenberg* W<sub>775</sub> w badanych pryzmach

\*) Badania finansowane przez KBN, nr grantu: 1030/P06/2001/20.

stanowiły grudki kompostu uformowane w kształcie kuli o średnicy około 5 cm, do których wprowadzano zawieszynę pałeczek. Następnie otaczano je warstwą świeżego kompostu o grubości około 5 cm i całość umieszczano w plastikowych workach o średnicy oczek 3 cm. Ilość nośników była wystarczająca dla oceny tempa inaktywacji badanych bakterii w intensywnej fazie kompostowania trwającej około 30 dni. W odstępach kilkudniowych wyciągano je z przyzmy i oznaczano liczebność pałeczek w oparciu o metodę NPL w zestawie 3-probówkowym. Zastosowano dwa podłoża namnażające. Początkowo próbki inkubowano w 1% wodzie peptonowej (24 godz. 37°C), a następnie przenoszono do selektywnie namnażającego podłoża wg Rappaporta (24 godz. 43°C). Po inkubacji materiał na selektywne podłoże agarowe BPLA wg Kaufmana. W końcowej fazie identyfikacji wykorzystano metody serologiczne. Uzyskane wyniki zweryfikowano i poddano analizie statystycznej w programie Statistica i wykreślono prostą regresji, na podstawie której wyliczono tempo eliminacji badanych bakterii w poszczególnych miejscach przyzmy kompostowych.

### Wyniki i omówienie

Wyniki badań przedstawiono na ryc. 2 i 3 oraz w tab. 1.

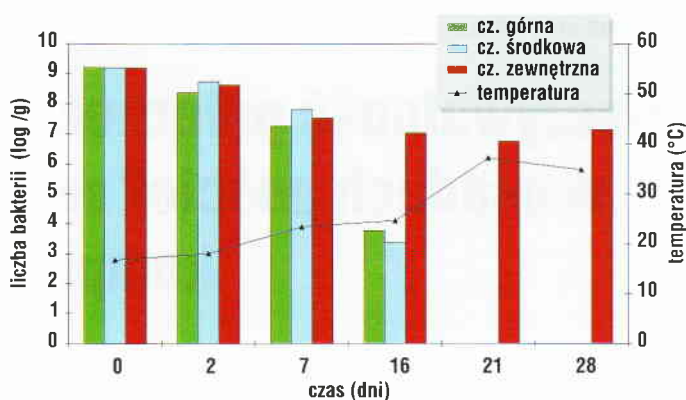
Tempo inaktywacji badanych bakterii w biomacie przyzmy kompostowych było wyraźnie zróżnicowane. W początkowym okresie doświadczenia liczebność pałeczek *Salmonella* wyrażona w postaci logarytmu w nośnikach umieszczonych w obu przyzmych wahała się od 8,615 jtk/g do 9,549 jtk/g. W trakcie procesu kompostowania liczba bakterii systematycznie spadała, jakkolwiek tempo ich inaktywacji było wyraźnie uzależnione od miejsca usytuowania nośnika w przyzmy.

W środkowej i górnej części przyzmy A ubytek populacji badanych mikroorganizmów był stosunkowo szybki i wynosił odpowiednio 0,34 i 0,36 log/dzień. Wyliczona w oparciu o prostą regresji przeżywalność

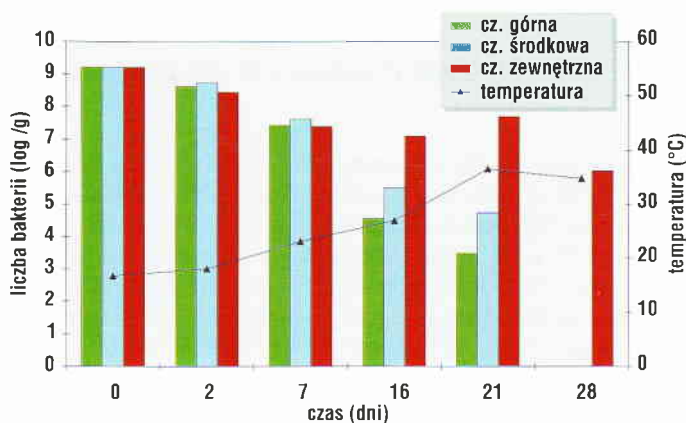
Tab. 1. Proste regresji przeżywalności pałeczek *S. senftenberg* W<sub>775</sub> w różnych warstwach przyzmy kompostowych

Próbka	Równanie regresji	r <sup>2</sup> (%)	Przeżywalność (dni)
A cz. górna	$y = -0,349x + 9,184^*$	93	26,33
A cz. środkowa	$y = -0,361x + 9,428$	47	26,1
A cz. zewnętrzna	$y = -0,071x + 8,615$	50,2	121
B cz. górna	$y = -0,302x + 9,368$	93,3	31,02
B cz. środkowa	$y = -0,285x + 9,549$	86,3	33,47
B cz. zewnętrzna	$y = -0,08x + 8,662$	46,24	108,01
Kontrola	$y = -0,095x + 8,844$	65,8	93,1

Objaśnienia: \* proste regresji wyrażone w postaci  $y = ax + b$ , gdzie a – średnia zmiana liczebności bakterii (wyrażona w postaci log) w ciągu jednego dnia; x – czas (wyrażony w dniach); b – teoretyczna liczba bakterii w początkowej fazie doświadczenia



Ryc. 2. Inaktywacja *S. senftenberg* W<sub>775</sub> w górnej, środkowej i zewnętrznej części przyzmy kompostowej (pryzma A)



Ryc. 3. Inaktywacja *S. senftenberg* W<sub>775</sub> w górnej, środkowej i zewnętrznej części przyzmy kompostowej (pryzma B)

bakterii była wyrównana i wynosiła 26,1-26,3 dni. Zdecydowanie wolniej obumierały bakterie w zewnętrznej części przyzmy. Dzienny spadek ich liczebności wynosił tylko 0,07 log, a przeżywalność wzrosła do 121 dni.

W przyzmy B zaobserwowano podobne zjawisko. Przeżywalność bakterii w środkowej i górnej części była stosunkowo krótka i nie przekraczała 34 dni.

Dzienny ubytek populacji wahał się w granicach od 0,29 do 0,32 log/dzień. W warstwie zewnętrznej przyzmy bakterie przeżywały 108 dni przy średnim dziennym ubytku ich liczebności o 0,08 log. Należy podkreślić, że warunki termiczne panujące w obu przyzmych były niewystarczające dla pełnej likwidacji patogenów znajdujących się w nośnikach. Badania temperatury w przyzmych wskazują, że faza termofilna nie rozwijała się w sposób prawidłowy i temperatura nie przekraczała wartości 40°C (ryc. 2 i 3). Mimo częstego napowietrzania biomasy, najprawdopodobniej jej struktura nie pozwalała na równomierny rozwój mikroorganizmów termofilnych, które są niezbędne dla pełnej higienizacji kompostu.

Zastosowanie osadów pościekowych do celów nawozowych może być limitowane poprzez ryzyko zagrożenia dla zdrowia ludzi i zwierząt wynikające z rozprzestrzeniania drobnoustrojów chorobotwórczych w środowisku. Dlatego też spośród innych metod higienizacji przeprowadza się proces kompostowania, w celu zmniejszenia liczby patogenów i stabilizacji materii organicznej. Osady pościekowe zawierają generalnie od  $10^2$  do  $10^3$  jtk pałeczek *Salmonella sp./g.s.m.* (4). W osadach odwodnionych, poddanych fermentacji beztlenowej może być nawet ponad  $10^5$  jtk/g.s.m. (23, 30).

Jakkolwiek kompostowanie uważane jest za efektywny proces eliminacji drobnoustrojów, niewielka liczba pałeczek *Salmonella* może w pewnych warunkach przetrwać w przypadku zbyt niskich temperatur generowanych w trakcie procesu (3). W badaniach własnych okres intensywnego kompostowania przeżywała znaczna liczba pałeczek, zwłaszcza w zewnętrznej części obu badanych pryzm. W zewnętrznych częściach pryzm przeżywalność bakterii wahała się w zakresie od 108 do 121 dni. Skład pryzm nie wywierał wpływu na intensywność tego zjawiska. W badaniach obserwowano stały spadek liczby badanych drobnoustrojów w biomacie kompostowanych osadów. Nie stwierdzono procesu namnażania się drobnoustrojów w żadnym punkcie pryzmy, chociaż takie zjawisko obserwowano we wcześniejszych eksperymentach (7). Możliwość namnażania się w biomacie kompostowanej pałeczek z rodzaju *Salmonella* zależy od temperatury, wilgotności, ilości substancji odżywczych, liczby mikroorganizmów autochtonicznych i jest ze względów higienicznych szczególnie niebezpieczna (11, 27). W sterylnym kompoście liczebność namnażających się pałeczek osiąga wartość nawet do  $10^7$  jtk/g.s.m. (2). Sidhu (25) sugeruje, że antagonistyczny wpływ mikroorganizmów autochtonicznych na patogeny występujące w biomacie spada wraz z okresem przechowywanego kompostu. Najsilniej mechanizm ograniczania liczebności drobnoustrojów chorobotwórczych (mimo obecności w biomacie substancji odżywczych) funkcjonuje w 2 pierwszych tygodniach kompostowania, a następnie wyraźnie maleje. Dojrzałość kompostu nie gwarantuje jego bezpieczeństwa pod względem higienicznym. Zbilansowanie długości okresu jego przechowywania z utratą zdolności antagonistycznych powoduje, że składowanie nie powinno przekroczyć 30 tygodni.

Należy podkreślić, że w warunkach stresowych, wywołanych między innymi w niewystarczającym stopniu podwyższoną temperaturą, niektóre szczepy *Salmonella* przechodzą w stan spoczynku zachowując swoją żywotność, lecz nie dają się hodować tradycyjnymi metodami. Nie można wykluczyć, że w badanych pryzmach zjawisko to również miało miejsce, bowiem uzyskiwane w procesie temperatury były zbyt niskie i mogły powodować subletalne uszkodzenie bakterii (viable but not culturable). W takich przypad-

kach dodanie nowobiocyny do podłoża namnażającego selektywnie podwyższa wykrywalność bakterii w ściekach o 14-16% w stosunku do konwencjonalnych metod (12). Antybiotyk hamuje wzrost bakterii z rodzaju *Proteus* (20) i gramodatnich ziarniaków (24), które często stanowią mikroflorę towarzyszącą w ściekach i kompostach, utrudniającą wzrost pałeczek. Dodatek do podłoża nowobiocyny oraz ferioxaminu w trakcie analizy prób kompostu zwiększa wykrywalność pałeczek *Salmonella* od 3 do 6%.

Dla oznaczenia liczebności badanych bakterii w przeprowadzonych badaniach posłużono się metodą z zastosowaniem dwóch podłoży namnażających. Podłoże wg Rappaporta-Vasilidadisa dla selektywnego namnażania pałeczek z rodzaju *Salmonella* stosowane jest do izolowania ich w próbkach wody, ścieków i osadów z dużym powodzeniem. Daje ono możliwość wzrostu większości serotypów pałeczek *Salmonella* i skutecznie hamuje wzrost mikroorganizmów towarzyszących (13, 21) w porównaniu z innymi podłożami. Hu i wsp. (10) dla zwiększenia efektywności oznaczeń prób ścieków i kompostów zalecają podłoże namnażające MSE (mannitol selenine enrichment) oraz LMG agar (lysine-mannitol-glycerol), które ich zdaniem są bardziej skuteczne w porównaniu do podłoża zalecanych przez przepisy sanitarne obowiązujące w USA. Należy podkreślić, że stosowane z dużym powodzeniem szybkie próby identyfikacji drobnoustrojów oparte o PCR i test ELISA w połączeniu z innymi metodami biologii molekularnej jak do tej pory nie znajdują zastosowania do rutynowego monitoringu osadów pościekowych.

W badaniach określano przeżywalność pałeczek *Salmonella senftenberg* W<sub>775</sub>. Serotyp ten, ze względu na dużą termooporność jest do tego typu badań szczególnie przydatny (22), bowiem w przypadku jego pełnej eliminacji można uznać, że inaktywowane zostały pozostałe mikroorganizmy, które cechuje o wiele mniejsza oporność na czynniki środowiskowe.

Pałeczki *Salmonella* w przypadku zachowania aktywności w kompostowanej biomacie, przedostają się do gleby, w której również mogą przeżywać dość długi czas. Dane piśmiennictwa określające przeżywalność drobnoustrojów w glebie są ekstremalnie różne i wahają się w zależności od warunków eksperymentu od 6 do ponad 500 dni (9, 18, 28). W sprzyjających warunkach salmonele mogą się przedostać w głąb profilu glebowego, a następnie do wód gruntowych, które stać się mogą wówczas źródłem zakażenia ludzi i zwierząt (6, 16, 17).

Przeprowadzone badania dowodzą, że istnieje realne zagrożenie zanieczyszczenia środowiska bakteriami chorobotwórczymi w przypadku źle kompostowanych osadów z oczyszczalni zbierającej ścieki komunalne i rzeźniane. Nakłada to konieczność przedsięwzięcia środków mających na celu wzmoczenie kontroli procesów uzdatniania. Są to pilne do uszczegółowienia kwestie, zwłaszcza w zakresie wprowadzenia



konieczności badań monitoringowych poszczególnych technologii utylizowania odpadów, które odpowiadająby standardom europejskim.

### Piśmiennictwo

1. *Böhm R.*: Verhalten ausgewählter Salmonellen in der Umwelt. Dtsch. tierärztl. Wschr. 1993, 100, 275-278.
2. *Brandon J. R., Burge W. D., Enkiri N. K.*: Inactivation by ionizing radiation of Salmonella enteritidis serotype montevideo grown in composted sewage sludge. Appl. Environ. Microbiol. 1977, 33, 1011-1012.
3. *Burge W. D., Enkiri N. K., Hussong D.*: Salmonella regrowth in composted as influenced by substrate. Microb. Ecol. 1987, 14, 243-253.
4. *Epstein E.*: The Science of Composting. Technomic Publishing Company Inc., Lancaster 1977.
5. *Gantzer C., Gaspard P., Galvez L., Huyard A., Dumouthier N. and Schwarzbrod J.*: Monitoring of bacterial and parasitological contamination during various treatment of sludge. Wat. Res. 2001, 35, 3763-3770.
6. *Gerba C. P., Wallis C., Melnick J. L.*: Fate of wastewater bacteria and virus in soil. I. Irrig. Drain. Div. ASCE, 1975, 101, 157-174.
7. *Gibbs R. A., Hu C. J., Ho G. E., Unkovich I.*: Regrowth of faecal coliforms and salmonellae in stored biosolids and soil amended with biosolids. Water Sci. Technol. 1997, 35, 269-275.
8. *Goldstein N., Yanko W. A., Walker J. M. and Jakubowski W.*: Determining levels in sludge products. Biocycle 1988, 29, 44-47.
9. *Hess E., Lott G., Breer C.*: Klärschlamm und Freilandbiologie von Salmonellen. Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. B. 1974, 158, 446-455.
10. *Hu C. J., Gibbs R. A., Ho G. E.*: Evaluation of culture media for detection of Salmonellae in composted biosolids. Wat. Res. 1997, 31, 2664-2667.
11. *Hussong D., Burger W. D., Enkiri N. K.*: Occurrence, growth, and suppression of Salmonellae in composted sewage sludge. Appl. Environ. Microbiol. 1985, 50, 887-893.
12. *Karuniawati A.*: Untersuchungen von Umweltproben auf „viable but not culturable“ Salmonellen und enterohämorrhagische Escherichia coli (EHEC). Verlag Grauer-Beuren, Stuttgart, 2001.
13. *Morinigo M., Martinez-Manzanares E., Munoz A., Sanchez J. M., Borrego J. J.*: Laboratory study of several enrichment broths for the detection of Salmonella spp. particularly in relation to water samples. J. Appl. Bacteriol. 1993, 74, 330-335.
14. *Paluszak Z., Bauza-Kaszewska J., Melech A.*: Effect of sewage sludge composting processes on inactivation of selected faecal bacteria. Chemical Products in Agriculture and Environment (Wyd. Górecki H., Dobrzański Z.), Czech-Pol Trade. 2002, 3, 374-379.
15. *Paluszak Z., Olszewska H., Szejniuk B.*: Survival and transport of *E. coli* and Salmonella spp. in soils fertilized with slurry. Proc. 9<sup>th</sup> Internat. Congress in Animal Hygiene, Helsinki 1997, s.642-645.
16. *Parrakova E., Mayer J.*: Vergleichende mikrobiologische Untersuchungen verunreinigter Böden. I. Teil: Quantitative Veränderungen der Mikroorganismen. Zbl. Bakt. Hyg. Abt. II 1971, 126, 521-529.
17. *Parrakova E., Mayer J.*: Vergleichende mikrobiologische Untersuchungen verunreinigter Böden. II. Teil: Veränderungen des Artenspektrums der Mikroorganismen. Zbl. Bakt. Hyg. Abt. II 1971, 126, 746-757.
18. *Pioch G., Bräunig I.*: Die Tenazität der Salmonellen in Umweltmedien und ihre Verbreitung mit Abprodukten. Z. Ges. Hyg. 1989, 35, 645-649.
19. *Plym-Forsell L.*: Survival of Salmonellas and Ascaris sum eggs in a thermophilic biogas plant. Acta Vet. Scand. 1995, 36, 79-85.
20. *Reissbrodt R., Rabsch W.*: Selective pre-enrichment of Salmonella from eggs by siderophore supplements. Zbl. Bakt. Abt. 1 Orig. 1993, 279, 344-353.
21. *Rhodes P., Quesnel L. B.*: Comparison of Muller-Kauffmann tetrathionate broth with Rappaport-Vassiliadis (RV) medium for the isolation of salmonellas from sewage sludge. J. Appl. Bacteriol. 1986, 60, 161-167.
22. *Roth S.*: Mikrobiologisch-hygienischen Untersuchungen zur Bioabfallkompostierung in Mieten und in Kleinkompostern. Praca dokt., Hohenheim 1994.
23. *Russ C. F., Yanko W. A.*: Factors affecting Salmonellae repopulation in composted sludges. Appl. Environ. Microbiol. 1981, 41, 597-602.
24. *Schadewinkel-Scherkl A. M., Scherkl R.*: Antibiotika und Chemotherapeutika in der tierärztlichen Praxis. Gustav Fischer Verlag, Jena, 1995, s.107-108.
25. *Sidhu J., Gibbs R. A., Ho G. E., Unkovich I.*: The role of indigenous microorganisms in suppression of Salmonella regrowth in composted biosolids. Wat. Res. 2001, 35, 913-920.
26. *Skanavis C., Yanko W. A.*: Evaluation of composted sewage sludge based soil amendments for potential risk of salmonellosis. Environ. Health 1994, 56, 7.
27. *Soares H. M., Cardenas B., Weir D.*: Switzenbaun M. S.: Evaluating pathogen regrowth in biosolid compost. BioCycle 1995, 35, 70-76.
28. *Strauch D.*: Survival of pathogenic micro-organisms and parasites in excreta, manure and sewage sludge. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 1991, 10, 813-846.
29. *Thunegard E.*: On the persistence of bacteria in manure. Acta vet. Scand. Suppl. 1975, 56, 1-86.
30. *Yanko W. A., Walker A. S., Jackson J. L., Libao L. L., Garcia A. L.*: Enumerating Salmonella in biosolids for compliance with pathogen regulations. Wat. Environ. Res. 1995, 67, 364-370.

Adres autora: prof. nadzw. dr hab. Zbigniew Paluszak, ul. Szymborska 45, 88-100 Inowrocław; e-mail: paluszak@atr.bydgoszcz.pl

Katedra i Klinika Rozrodu, Chorób Przeżuwaczy oraz Ochrony Zdrowia Zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej we Wrocławiu oraz

Sekcja Fizjologii i Patologii Rozrodu oraz Sztucznego Unasienniania PTNW

organizują sesję naukową

poświęconą 80-rocznicy urodzin prof. dr. hab. Zbigniewa Samborskiego

tematyka sesji:

## Problemy w rozrodzie zwierząt wysokoprodukcyjnych

Sesja odbędzie się w dniach 13–14.06.2003 roku w hotelu „SANA” w Polanicy Zdroju. Zgłoszenia referatów i doniesień do 15.04.2003 r.

Materiały należy przygotować w formacie \*.doc (Microsoft Word dla Windows); tabele, ryciny, rysunki w osobnym pliku; tekst Times New Roman 12; odstęp 1,5; margines 2,5. Układ tekstu: tytuł, autorzy, adres, doniesienia na jedną stronę. Materiały należy przelać na adres: prof. dr hab. Edward Malinowski; PiWet, Zakład Fizjopatologii Rozrodu i Gruczołu Mlekowego; 85-090 Bydgoszcz; Al. Powstańców Wilk. 10; e-mail: [vetri@logonet.com.pl](mailto:vetri@logonet.com.pl) lub [twardon@ozi.ar.wroc.pl](mailto:twardon@ozi.ar.wroc.pl)

Zgłoszenie uczestnictwa przyjmuje: prof. dr hab. Jan Twardoń; Katedra i Klinika Rozrodu, Chorób Przeżuwaczy oraz Ochrony Zdrowia Zwierząt, Wydz. Med. Wet. Akademia Rolnicza we Wrocławiu; 50-366 Wrocław; pl. Grunwaldzki 49; e-mail: [twardon@ozi.ar.wroc.pl](mailto:twardon@ozi.ar.wroc.pl); tel/fax 320 53 06, 320 53 18