

Przeżywalność *Salmonella* sp. w wodach powierzchniowych w zmiennych warunkach termicznych

*Katarzyna Budzińska, Adam Brudnicki, Adam Traczykowski
Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy, Bydgoszcz*

1. Wstęp

Kwestia destruktywnych oddziaływań człowieka na ekosystemy wodne jest bardzo złożona i wielopłaszczyznowa. Woda ze względu na ogólną dostępność jest środowiskiem, które odgrywa bardzo ważną rolę w rozprzestrzenianiu się chorób. Najbardziej podatne na zanieczyszczenia bakteryjne są wody powierzchniowe, a najczęściej izolowane ze środowiska wodnego bakterie chorobotwórcze to patogeny pochodzenia jelitowego mogące dostawać się do wody wraz z kałem zwierząt, a także ściekami bytowo gospodarczymi [3]. Występowanie bakterii chorobotwórczych w wodach wykorzystywanych do celów rekreacyjnych jest szczególnie niebezpieczne ze względów epidemiologicznych. Dostęp do zainfekowanej wody podczas sezonu wypoczynkowego ma tysiące osób, co w połączeniu z wirulencją *Salmonella* sp. stwarza bardzo duże zagrożenie dla ludzi oraz kreuje doskonałe warunki dla szybko rozprzestrzeniającej się infekcji [2]. Szczególny niepokój z kilku przyczyn budzi wśród specjalistów zanieczyszczenie wód bakteriami z rodzaju *Salmonella*. Po pierwsze mimo, iż w zbiornikach wodnych istnieje bardzo mała liczba pałeczek z rodzaju *Salmonella* to przedostanie się bakterii wraz z wodą do przewodu pokarmowego może skutkować infekcją. Dzieje się tak ze względu na szybkie tempo przejścia wody przez żołądek do jelita, w rezultacie czego unika ona naturalnej bariery ochronnej. Po drugie w porównaniu z innymi bakteriami allochtonicznymi, *Salmonella* sp. charakteryzuje się bardzo wysokim współczynnikiem przeżywalności w ekosystemach wodnych; ponadto jest bardziej odporna na stresory środowiskowe oraz wahania warunków abiotycznych, co czyni ją wysoce niebezpieczną dla zdrowia ludzi [8]. Po trzecie istnieje potwierdzona badaniami korelacja po-

między stężeniem wskaźników zanieczyszczenia w wodzie, a realnym prawdopodobieństwem wystąpienia zaburzeń żołądkowych u kąpiących się [9]. Kolejnym problemem jest fakt stosowania ścieków, jako nawozu do użyźniania gleb znajdujących się nad ciekami wodnymi. Ich stosowanie, zwłaszcza w postaci nieoczyszczonej, wydaje się niewłaściwe ze względu na olbrzymi ładunek zanieczyszczeń mikrobiologicznych jaki ze sobą nosą. Zagrożeniem jest także brak efektywnych metod oczyszczania ścieków jeżeli liczba bakterii w ściekach sięga 10^3 – 10^5 jtk/ml [10].

W Polsce 94% zakażeń pokarmowych to zakażenia powodowane przez pałeczki z rodzaju *Salmonella*. Dlatego bakterie te traktowane są jako bardzo niebezpieczne [11]. W 2006 roku zarejestrowano ogółem 865 zachorowań na salmonellozy (zapadalność 41,9 na 100 000), a więc o 524 przypadki mniej niż w 2005 roku. Jednak mimo spadku ogólnej liczby przypadków zachorowań wykazano, iż coraz więcej osób jest nosicielami tych drobnoustrojów. Biorąc pod uwagę kilka ostatnich dekad, salmonellozy stały się rosnącym problemem o bardziej środowiskowym charakterze w krajach wysoko uprzemysłowionych.

Wykrywanie pałeczek w środowisku wodnym jest ściśle skorelowane z ludzką lub zwierzęcą aktywnością w danym miejscu. Dzieje się tak dlatego, iż *Salmonella* sp. jest zdolna do zainfekowania bardzo dużej liczby różnych gatunków zwierząt, przy czym identyfikacja źródła środowiskowego zanieczyszczenia nie zawsze jest możliwa. Ponadto wysoki współczynnik przeżywalności, zarówno w wodzie, jak i innych środowiskach, zwiększa prawdopodobieństwo infekcji nowego gospodarza. Z tego powodu tak ważne jest prowadzenie badań nad przeżywalnością w środowiskach wodnych oraz odpowiedź na pytania z nią związane.

Celem pracy była ocena wpływu wybranych temperatur na przeżywalność pałeczek z rodzaju *Salmonella*, a także dynamika zmian ilościowych bakterii w czasie, w wodach kąpieliskowych wykorzystywanych na cele rekreacyjne, w warunkach laboratoryjnych.

2. Materiały i metody

Miejscem poboru prób do badań było Jezioro Borówno w gminie Dobrcz, w powiecie bydgoskim.

2.1. Charakterystyka Jeziora Borówno

- powierzchnia 43,2 ha,
- objętość 3305,6 tys. m³,
- głębokość maksymalna 14,1 m,
- powierzchnia zlewni całkowitej 3,5 km²,
- powiat bydgoski,
- rodzaj zlewni bezodpływowa.

Zlewnia jeziora Borówno położona jest na obszarze bezodpływowym Wysoczyzny Świeckiej. Na obszerną sieć cieków zlewni składają się przede wszystkim śródpolne rowy melioracyjne, które mają w większości charakter okresowy i wykorzystywane są wiosną [14]. Misa jeziorna założona jest w utworach gliniastych. Jezioro posiada II kategorię odporności na degradację, co oznacza, że jest obiektem średnio odpornym na działanie czynników zewnętrznych [14]. Wśród najważniejszych czynników wpływających negatywnie można wymienić strukturę użytkowania zlewni, w której dominują użytki rolne, stanowiące aż 71%. Poważne znaczenie jako czynnik ułatwiający degradację ma także wskaźnik wydłużenia jeziora, którego niska wartość sprawia, iż istnieje niewielka zdolność do rozcieńczania zanieczyszczeń pochodzących z zewnątrz. Ponadto jezioro charakteryzuje się słabą stratyfikacją, co może wpływać na dostępność biogenów w strefie eufotycznej jeziora [14]. Wojewódzki Inspektorat Ochrony Środowiska nie zewidencjonował zrzutów ścieków do jeziora. Dużym zagrożeniem dla stanu wód kąpieliskowych jeziora Borówno mogą być zbiorniki bezodpływowe położone na terenie ogródków działkowych na wschodnim brzegu jeziora, o które oparta jest gospodarka wodno-ściekowa na obszarze zlewni. Ogrody działkowe stanowią źródło silnej antropopresji, łącznie z ośrodkami wypoczynkowymi działającymi na zachodnim brzegu jeziora są potencjalnym źródłem zagrożeń. Szacuje się, iż w sezonie letnim nad brzegami jeziora wypoczywa w trakcie weekendu nawet ok. 6000 osób.

2.2. Procedura prowadzenia badań mikrobiologicznych

Dwa szklane sterylne pojemniki o pojemności 5 litrów napełniono wodą z jeziora poprzez ich zanurzenie na średnią głębokość zanurzenia osoby pływającej (20÷30 cm). Następnie pojemniki przetransportowano do laboratorium. Przygotowano zawiesinę wprowadzając do ampułki zawierającej 5 ml sterylnej wody demineralizowanej namnożone na agarze BHI (Brain Heart Infusion) kolonie *Salmonella senftenberg*. Liczba komórek w 1ml szczepionki określona za pomocą densytometru optycznego wynosiła 10^{10} . Zawiesinę wprowadzono do pojemników zawierających wodę z jeziora, całość dokładnie wymieszano i pozostawiono w temperaturze pokojowej na godzinę. Po tym czasie wykonano pierwsze oznaczenie liczby komórek *Salmonella* sp. w 1 ml badanej wody. Pojemniki z wodą umieszczono w temperaturach 4 i 20°C. Kolejne analizy wykonano po 1 tygodniu od rozpoczęcia eksperymentu, a następne w odstępach 14 dniowych. Całkowity okres badań obejmował 13 tygodni.

Oznaczenie liczby *Salmonella* sp. w pobieranych próbkach przeprowadzono metodą NPL. Izolację tych bakterii wykonano w czterech etapach. Pierwszy etap stanowiło przednamnażanie w zbuforowanej 1% wodzie peptonowej (inkubacja w temperaturze 37°C przez 24 godziny). Selektywne namnażanie

wykonano w płynnej pożywce wg Rappaporta z dodatkiem tetratationianu i zieleni malachitowej (inkubacja w temperaturze 41°C przez 48 h). Kolejnym etapem było przeniesienie hodowli na podłoże agarowe BPLA z zielenią brylantową, czerwienią fenolową i laktozą oraz na podłoże agarowe XLD z ksylozą, lizyną i dezoksychohanem. Inkubacja była przeprowadzona w temperaturze 37°C przez 24 h. Na podłożu BPLA typowe kolonie *Salmonella* sp. rosły w postaci bladoróżowych kolonii, które były otoczone charakterystycznym różowym zabarwieniem agaru. Natomiast na podłożu XLD typowe kolonie tych bakterii rosły w postaci drobnych kolonii z czarnym środkiem, wokół których występowała jasnoczerwona otoczka. Ostatnim etapem była identyfikacja, która polegała na zastosowaniu testów serologicznych (reakcje z surowicami) i biochemicznych (mikrotest API 20E). Wyniki badań przeżywalności pałeczek *Salmonella* sp. w wodzie zweryfikowano, a następnie poddano analizie statystycznej w oparciu o zmiany ilości badanych bakterii w czasie według wzoru:

$$\log(N) = ax + b \quad (1)$$

gdzie:

- N – liczba bakterii w danym czasie w wodzie,
- a – współczynnik kierunkowy, odpowiadający średniej zmianie liczby bakterii w postaci log na jeden tydzień,
- x – czas w tygodniach,
- b – wyraz wolny odpowiadający teoretycznie log liczby bakterii w czasie zerowym, zaangażowanych w dany proces.

Obliczono współczynniki: korelacji, determinacji i regresji oraz określono istotności różnic między badanymi cechami. Ponadto ustalono teoretyczny czas przeżycia, a także tempo eliminacji *Salmonella* sp. w wodzie na podstawie przebiegu krzywych regresji. Analizę uzyskanych wyników przeprowadzono za pomocą programu statystycznego Statistica 6.0.

3. Wyniki badań i ich omówienie

W porównaniu z innymi bakteriami *Salmonella* charakteryzuje się bardzo wysokim współczynnikiem przeżycia w środowiskach wodnych; potrafi przeżyć takie bakterie jak *Staphylococcus aureus* czy *Vibrio cholerae* (DiRita, 2001). Wszechobecność pałeczek.

W przeprowadzonym badaniu medium pałeczek z rodzaju *Salmonella* była woda z jeziora wykorzystywana w celach rekreacyjnych. Wyniki badań, które dotyczyły przeżywalności pałeczek *Salmonella* sp. w wodzie w poszczególnych temperaturach przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Liczba bakterii *Salmonella* sp. w wodzie w temperaturze 20 i 4°C

Table 1. Number of *Salmonella* sp. in water at 20 and 4°C

Tygodnie badań	Liczba <i>Salmonella</i> sp. w 20°C		Liczba <i>Salmonella</i> sp. w 4°C	
	(jtk/ml)	Log 10	(jtk/ml)	Log 10
1	$1,5 \cdot 10^7$	7,18	$9,5 \cdot 10^8$	8,98
3	$9,5 \cdot 10^7$	7,98	$9,5 \cdot 10^9$	9,98
5	$9,5 \cdot 10^6$	6,98	$20,0 \cdot 10^7$	8,3
7	$4,5 \cdot 10^3$	3,65	$20,0 \cdot 10^6$	7,3
9	$2,5 \cdot 10^4$	4,4	$9,5 \cdot 10^4$	4,98
11	$4,5 \cdot 10^2$	2,65	$9,5 \cdot 10^4$	4,98
13	–	–	$2,5 \cdot 10^3$	3,4

Tabela 2. Współczynniki regresji charakteryzujące dynamikę inaktywacji pałeczek *Salmonella* sp. w wodzie w temperaturze 4 i 20°C

Table 2. Indexes characterizing *Salmonella* sp. inactivation dynamics in water at 4 and 20°C

Temperatura wody	Współczynnik a	Współczynnik b	r ²	Współczynnik korelacji	Max. czas przeżycia (dni)
4°C	-0,54±0,01	10,60±0,25	0,91	-0,95**	140
20°C	-0,62±0,01	9,04±0,36	0,87	-0,93**	91

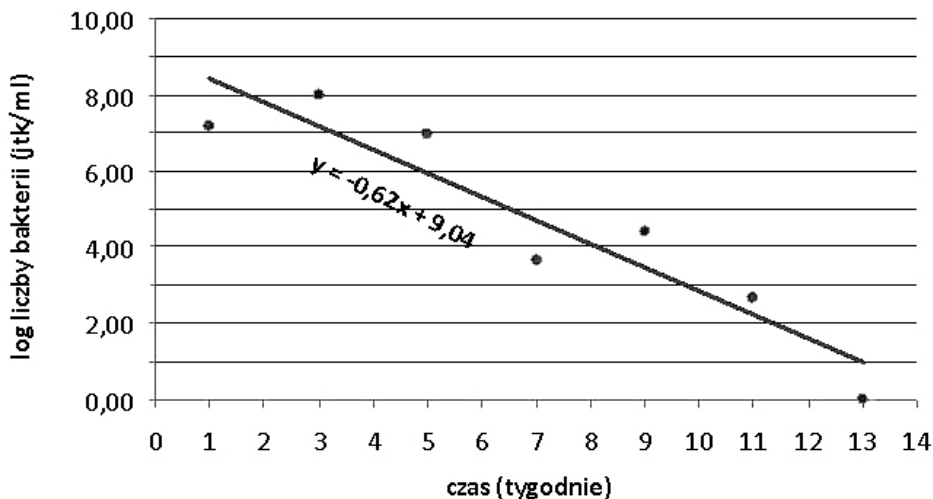
** p<0,01

Jak podaje Gibson [5] pałeczki z rodzaju *Salmonella* w zanieczyszczonej wodzie mogą przeżyć ponad 4 miesiące. W wodzie wcześniej jałowionej bakterie te są w stanie przetrwać około 2 miesiące. Warunkiem przeżycia w takim przypadku jest dostęp tlenu, którego brak skutkuje unicestwieniem drobnoustrojów w ciągu 4 dni [13]. Wyniki otrzymane w badaniach własnych potwierdzają badania Dragera [4] zgodnie, z którymi *Salmonella* w środowisku wodnym przeżywa od 3 do około 7 miesięcy [12]. W badaniach własnych tempo redukcji populacji bakterii, według analizy regresji wynosiło w 4°C 0,54 log/tydzień, natomiast w 20°C było wyższe i przyjmowało wartość 0,62 log/tydzień. W związku z powyższym sądzić można, iż niższa temperatura działa stabilizująco na wzrost pałeczek z rodzaju *Salmonella*.

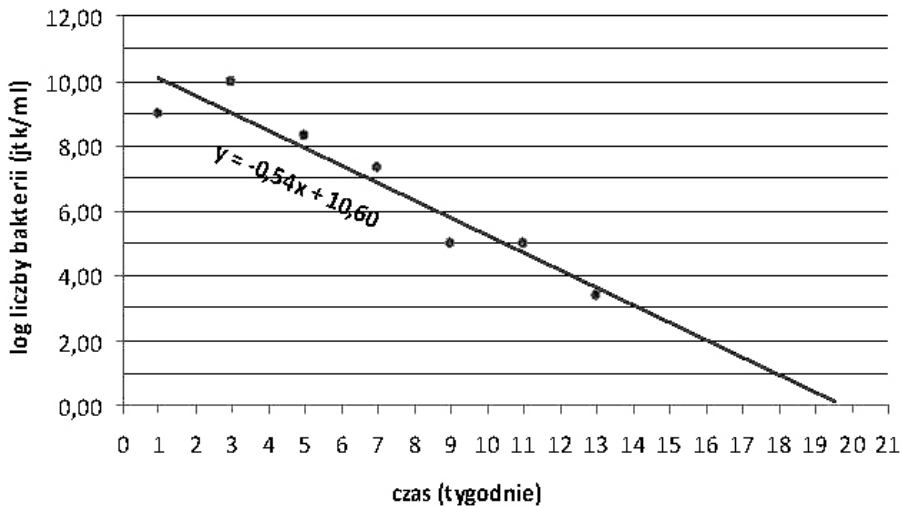
Podobne wyniki otrzymali podczas badań Chandran i Hatha [3], którzy zauważyli, iż pałeczki *S. typhimurium* dłużej przeżywają w niższych temperaturach. Fakt ten może być związany ze spadkiem tempa metabolizmu, jaki zachodzi właśnie w niskich temperaturach. Podczas własnych badań zaobserwowano chwilowe wzrosty liczebności wykrywanych bakterii w wodzie w temperaturze 4°C, podobnie jak i w temperaturze 20°C. W temperaturze 20°C stopni dostrze-

żono dwa skoki liczebności bakterii, natomiast w temperaturze 4°C jeden zasadniczy skok. Po zwiększeniu się liczby bakterii obserwowano ich gwałtowny spadek, zarówno w jednej, jak i drugiej temperaturze. Początkowe zwiększanie się liczby drobnoustrojów może być związane z obecnością w wodzie jeziornej biogenów. Sprawiało to, iż bakterie w tym czasie znalazły znakomite warunki do rozwoju i namnażania, stąd odnotowany początkowy wzrost ich liczby. Po okresie wzrostu zaobserwowano gwałtowny spadek liczby drobnoustrojów w temperaturze 4°C podczas 5 tygodnia badań, natomiast w temperaturze 20°C trwał on od 5 do 7 tygodnia badań. Spadek eliminacji mógł być wynikiem wyczerpania się składników pokarmowych, czego skutkiem mogło być wydłużenie okresu międzypodziałowego.

W 9 tygodniu zaobserwowano kolejny nieznaczny wzrost liczby drobnoustrojów w temperaturze 20°C, a także stagnację liczebności w temperaturze 4°C, co mogło być następstwem dostarczenia niewielkich ilości składników odżywczych przez komórki bakterii obumarłych na skutek szoku środowiskowego. Adaptacja oraz przetrwanie drobnoustrojów w środowisku zależy w ogromnym stopniu od interakcji zachodzących pomiędzy komórkami, w tym od współzawodnictwa [1], które pozwala przeżyć bakteriom o większych możliwościach regeneracji.



Rys. 1. Prosta regresji przeżywalności *Salmonella* sp. w wodzie w temperaturze 20°C
 Fig. 1. Regression line of *Salmonella* sp. survival in water at 20°C



Rys. 2. Prosta regresji przeżywalności *Salmonella* sp. w wodzie w temperaturze 4°C

Fig. 2. Regression line of *Salmonella* sp. survival in water at 4°C

Podczas badań zauważono, iż bakterie łączyły się w większe skupiska o konsystencji śluzu. Zauważono także sedymentowanie tych tworów na dno zbiorników, co może mieć znaczenia dla ich przeżycia w wodzie [6]. Maki i Hicks [7] próbowali uzyskać odpowiedź na pytanie czy łączenie się komórek pałeczek z rodzaju *Salmonella* w większe agregaty oraz ich łączenie się z wodnymi zawiesinami zwiększa czas ich przeżycia. Zaobserwowali oni, iż komórki bakterii, które łączą się z cząstkami zawiesin bardziej wydajnie wykorzystują biogeny a także są większe. Ponadto wykazali, że uszkodzone komórki pałeczek *Salmonella*, zbijając się w większe skupiska, zwiększały swoją możliwość przeżycia. Podczas aeracji wody w pojemnikach powstałe agregaty ulegały częściowemu rozbićciu, co mogło wpływać negatywnie na komórki. Mącenie wody może wpływać niekorzystnie na przeżycie drobnoustrojów w wodzie, ponieważ dłużej utrzymują się one w zbiornikach o wodzie stojącej. Ze względu na ruchy wody, rekreacyjne wykorzystanie zbiorników skutecznie utrudnia im przeżycie. Z drugiej jednak strony, okresowe mieszanie sprawia, iż z dna zbiorników unoszą się skumulowane substancje biogenne uwalniane w tym czasie do wyższych warstw, ponadto woda ulega napowietrzeniu, co sprzyja rozwojowi pałeczek z rodzaju *Salmonella*. Podobne warunki stwarzało mieszanie wody w pojemnikach, co mogło być jedną z przyczyn odnotowanych wzrostów liczby bakterii.

4. Wnioski

1. Z przeprowadzonych badań wynika, że temperatura wody jest jednym z czynników mających decydujący wpływ na tempo eliminacji pałeczek z rodzaju *Salmonella*.
2. Ustalono, iż w wodzie jeziornej pałeczki te szybciej obumierają w temperaturze 20°C w porównaniu z temperaturą 4°C.
3. Obliczony z równań prostych regresji teoretyczny czas przeżycia badanych drobnoustrojów w wodzie wynosił 13 tygodni w temperaturze 20°C oraz 20 tygodni w temperaturze 4°C.
4. Długi czas przeżycia bakterii *Salmonella* w systemach wodnych oraz ogólna dostępność wody, stanowi potencjalne zagrożenie dla zdrowia ludzi i zwierząt.

Literatura

1. **Babynin E. V.:** *The effect of extracellular metabolites on the frequency of thy revertants in Salmonella typhimurium populations.* Mikrobiologiya, 75, 4, 521-524, 2006.
2. **Brookes J. D., Antenucci J., Hipsey M., Burch M. D., Ashbolt N. J., Ferguson C.:** *Fate and transport of pathogens in lakes and reservoirs.* Environment International, 30, 5, 741-759, 2004.
3. **Chandran A., Hatha A. A. M.:** *Relative survival of Escherichia coli and Salmonella typhimurium in a tropical estuary.* Water Research, Oxford, 39, 1397-1403, 2005.
4. **Drager H.:** *Salmonellose.* Akademie-Verlag, Berlin, 1971.
5. **Gibson E. A.:** *Reviews of the progress of the dairy science: Salmonella infection in cattle.* Journal of Dairy Research, 32, 97-134, 1965.
6. **Janakiraman A., Leff L.G.:** *Comparison of Survival of Different Species of Bacteria in Freshwater Microcosms.* Journal of Freshwater Ecology, 14, 2, 233-240, 1999.
7. **Maki R. P., Hicks R. E.:** *Salmonella typhimurium survival and viability is unaltered by suspended particles in freshwater.* Journal of Environmental Quality 31, 1702-1709, 2002.
8. **Mollie D., Groisman W., Groisman E. A.:** *Role of nonhost environments in the lifestyles of Salmonella and Escherichia coli.* Appl. Environ. Microbiol., July, 69, 7, 3687-3694, 2003.
9. **Ołańczuk-Neyman K.:** *Mikrobiologiczne aspekty odprowadzania ścieków do przybrzeżnych wód morskich.* Inżynieria Morska i Geotechnika, 2, 55-62, 2003.
10. **Olszewska H., Paluszak Z., Szejniuk B.:** *Przeżywalność Salmonella enteritidis w warunkach laboratoryjnych w gnojowicy i ścieku komunalnym.* Roczn. Nauk. Zoot., 26, 3, 275-285, 1999.
11. **Paluszak Z., Bauza-Klaszewska J., Ligocka A.:** *Przeżywalność pałeczek Salmonella senftenberg W 775 w osadach pościekowych poddanych procesowi kompostowania.* Med. Wet., 59, 3, 239-241, 2003.

12. **Strzałkowski L., Kopczeński A.:** *Przeżywalność w ziemi i w wodzie pałeczek Salmonella izolowanych od lisów.* Med. Wet., 47, 9, 397-399, 1999.
13. **Truszczyński M.:** *Bakteriologia weterynaryjna.* WPRiL, Warszawa, 1984.
14. **WIOŚ Bydgoszcz** *Stan czystości Jeziora Borówno na podstawie badań 2002, 2003.*

Survival of *Salmonella* sp. in Surface Waters under Variable Thermal Conditions

Abstract

The majority of cases of salmonellosis reported in the journals are related with food. Nevertheless, a number of studies have investigated the incidence and survival of salmonella in rivers, coastal water and lakes. *Salmonella* is frequently isolated from water sources, which serve as bacterial reservoirs and may possibly aid transmission between hosts. *Salmonella* is constantly released into the environment from infected humans, farm animals, pets, and wildlife. Compared to other microorganisms, *Salmonella* sp. has high survival ratio in aquatic environments it outlives *Staphylococcus aureus* and even the waterborne *Vibrio cholerae* in surface waters and in heavily eutrophied river water. Nutrient lack, osmotic stress, visible light and temperature appear to be the abiotic factors that most negatively influence survival. The presence of *Salmonella* sp. in aquatic environments does not vary seasonally and is independent of water temperature. Due to its common accessibility, water is an environment which plays an essential role in spread of diseases. The aim of this study was to estimate the effect of selected temperatures on the survival rate of bacilli of the genus *Salmonella*, and the dynamics of quantitative changes of the bacteria in time in bathing waters used for recreation, tested under laboratory conditions. The samples for the study were collected from Borówno lake in the commune of Dobrcz, county Bydgoszcz. In the experiment it was stated that *Salmonella* bacilli survived longer in water at 4°C (20 weeks), as compared with 20°C (12 weeks). According to regression analysis, reduction rate of bacterial population in the present study at 4°C was 0.54 log, while at 20°C it was higher and amounted to 0.62 log. Therefore, it can be concluded that a lower temperature has a stabilizing effect on bacilli of the genus *Salmonella*.

