

**JULITTA GAJEWSKA^{*}, MEDARD WYCECH^{*},
WAWRZYNIEC PLADYS^{**}, PAWEŁ SYSA^{***}**

**MIKROBIOLOGICZNE WSKAŹNIKI SKAŻENIA
SANITARNEGO GLEBY W OKOLICY PRZECIEKAJĄCEGO
ZBIORNIKA BEZODPŁYWOWEGO
NA NIECZYSTOŚCI CIEKŁE**

Streszczenie

Celem pracy było określenie wskaźników mikrobiologicznych pozwalających potwierdzić zjawisko nieszczelności szamba, przez skażenie pobliskiej gleby ściekami komunalnymi. Z próbek ścieków i gleby wyizolowano i zidentyfikowano kilka gatunków bakterii, stanowiących potencjalne sanitarne zagrożenie dla środowiska: Escherichia coli, Enterococcus faecalis, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Clostridium difficile, Streptococcus uberis.

Słowa kluczowe: ścieki komunalne, szambo, wskaźniki mikrobiologiczne, bakterie chorobotwórcze, gleba

WPROWADZENIE

Zjawisko zanieczyszczenia środowiska ściekami stanowi ważny problem. Czasem jest on nawet lekceważony, bądź niezauważalny, zwłaszcza w odniesieniu do prywatnych posesji z domkami jednorodzinnymi.

Przedostające się do gleby i wód gruntowych ścieki są groźne dla środowiska ze względu na występujące w nich szkodliwe czynniki biologiczne. Wśród nich wymienić można takie grupy jak: wirusy, grzyby, pierwotniaki, robaki pasożytnicze i bakterie. Można je znaleźć zarówno w ściekach surowych, jak i w tych, które zostały podane oczyszczaniu [Błaszczuk 2007, Cyprowski, Krajewski 2003, Gołofit-Szymczak 2007, Romdhana i in. 2009, Toze 1999, Zamorska 2007]. Biorąc pod uwagę specyficzne warunki powstawania ścieków, w ich

* Samodzielny Zakład Biologii Mikroorganizmów, SGGW Warszawa

** Ecofair, Warszawa

*** Zakład Histologii i Embriologii SGGW Warszawa

składzie można wykryć charakterystyczne dla bioty przewodu pokarmowego gatunki bakterii, w szczególności takie, które są obecne w kale ludzi oraz zwierząt. Są to m.in. bakterie należące do rodzaju: *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Mycobacterium*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, oraz rodziny *Enterobacteriaceae* (*E. coli*, *Salmonella* sp., *Shigella* sp. *Proteus* sp.) [Błaszczyk 2010, Cyprowski, Krajewski 2003, Gołofit-Szymczak 2007, Maukonen i in. 2008, Romdhana i in. 2009, Toze 1999, Zamorska 2007].

Ważne jest szybkie reagowanie i przeciwdziałanie zagrożeniom, wynikającym z zanieczyszczenia gleby ściekami z nieszczelnych instalacji przeznaczonych do ich magazynowania i transportu. Stąd niezbędne jest poszukiwanie wskaźników mikrobiologicznych, potwierdzających nieszczelności tych konstrukcji.

OBIEKT BADAŃ

Obiektem badań był trzy komorowy, pierścieniowy zbiornik bezodpływowy na nieczystości ciekłe, znajdujący się na prywatnej posesji na terenie Warszawy oraz otaczający go grunt. Obiekt funkcjonuje od 2002 roku. Przy oddaniu zbiornika do użytku, zabezpieczono go i uszczelniono, aby spełniał obowiązujące przepisy. Zbiornik jest opróżniany średnio co 3-4 tygodnie. Na terenie posesji w ciągu doby z wody korzystają średnio 4 osoby. Wystąpił problem z nieszczelnością zbiornika ze względu na uszkodzone dno w pierwszej komorze oraz prawdopodobne uszkodzenia pomiędzy pierścieniami (kręgami) w komorach. Obiekt znajduje się ok. 3m od budynku mieszkalnego.

METODYKA BADAŃ

Do badań pobrano 1 próbkę ścieków z przeciekającego zbiornika bezodpływowego na nieczystości ciekłe – szamba (S), 3 próbki gleby z odległości 1 m od zbiornika, w tym: próbka X I z powierzchniowej warstwy gleby pobrana łaską Egnera, z 1 m (X II) i 2 m głębokości (X III), pobrane świdrem ręcznym – odwiert, a także 3 odpowiadające im próbki kontrolne z odległości 13-16 m od zbiornika (odwierty w odległości 14,5 m, oznaczone jako K I – K III). Następnie przeprowadzono mikrobiologiczne badania ilościowe i jakościowe, mające na celu określenie liczebności poszczególnych grup bakterii i izolację oraz identyfikację bakterii patogennych. Użyto następujące podłoża: TSA, Columbia Agar, podłoże Baird-Parker'a, Endo Agar, podłoże MacConkey'a, *Streptococcus* Agar, *Cetrymide* Agar, King B. W celu poszukiwania bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* oraz *Staphylococcaceae* dodatkowo zastosowano Petrifilmy

firmy 3M (*Enterobacteriaceae*, Staph Express, ogólna liczba drobnoustrojów tlenowych). Identyfikację potencjalnych patogenów wykonano zgodnie z systematyką wg Bergey's Manual of Systematic Bacteriology [De Vos i in. 2009, Staley i in. 2005], na podstawie badań cech morfologicznych (kolonii i komórek), hodowlanych, fizjologicznych i biochemicznych. Do oznaczenia cech biochemicznych wykorzystano płytkowe testy biochemiczne (m.in. dot. syntezy katalazy i oksydazy) oraz testy API firmy bioMerieux (20NE, API Staph, API Strep, 20A). Dokumentację zdjęciową izolatów wykonano przy pomocy mikroskopu Nikon E600 sprzężonym z kamerą.

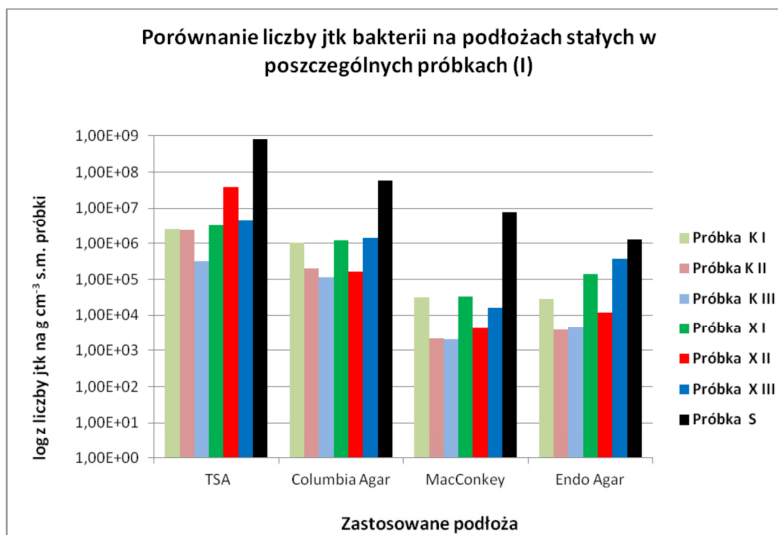
WYNIKI BADAŃ

Wyniki przedstawiające liczebność bakterii na zastosowanych w badaniach podłożach stałych przedstawiono na rys. 1 i rys. 2.

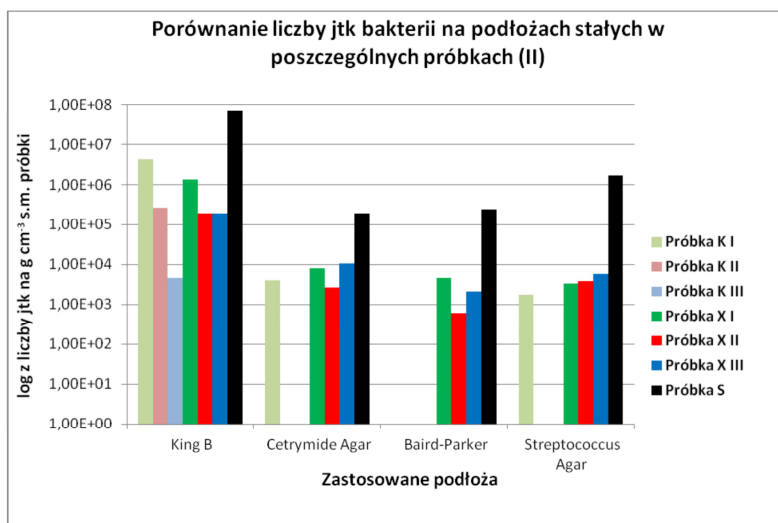
Analiza wyników wskazuje, że w próbkach gleby pobranej przy zbiorniku bezodpływowym (X I – X III) liczebność hodowlanych bakterii jest w znacznym stopniu wyższa na większości z stosowanych podłoży (przeważnie od 10 do 1000 razy), niż w próbkach gleby kontrolnej (K I – K III). Szczególnie jest to zauważalne, gdy porównamy próbki K III i X III, pobrane z głębokości 2 m. Najmniej widoczne różnice zaobserwowano w przypadku podłoży TSA i Columbia Agar. Podobne, mniej zaznaczające się różnice (lub ich brak) widać przy porównaniu powierzchniowych próbek K I i X I. Wyjątek stanowi tutaj podłoże Baird-Parker, gdzie na płytkach Petriego z zaszczepionym materiałem pochodzącym z kontrolnej próbki K I nie odnotowano wzrostu bakterii. W próbce ścieków (S) stwierdzono największą liczebność bakterii w przypadku każdego zastosowanego podłoża.

Na rys. 3 przedstawiono wyniki porównujące liczebność wyhodowanych bakterii z użyciem tradycyjnych metod płytkowych Kocha i testów Petrifilm (ogólnej liczby bakterii tlenowych, bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* oraz należących do *Staphylococcaceae*).

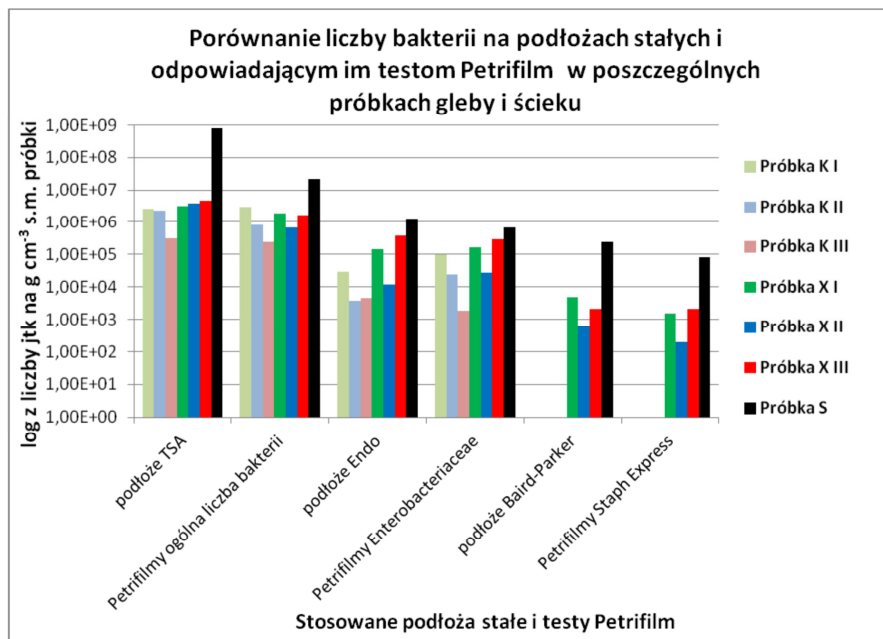
Analiza wyników badań (rys. 3), wykazuje istotne podobieństwa w uzyskanej liczebności bakterii na Petrifilmach z oznaczeniami dokonanyymi przy użyciu płytek Petriego (wszystkie trzy badania porównawcze). Największą liczbę bakterii wykazano w próbce ścieków (S), przy zastosowaniu obu metod. Zauważono znaczące różnice w liczebności bakterii pomiędzy próbkami kontrolnymi gleby (K I – K II), a ich odpowiednikami pobranymi przy zbiorniku bezodpływowym (X I – X III). Różnice te nie są jedynie tak dobrze widoczne w badaniu przeprowadzonym przy użyciu podłoża TSA i Petrifilmów na ogólną liczbę tlenowych bakterii. W próbkach z otoczenia zbiornika (X I – X III), liczebność drobnoustrojów była przeważnie większa od 10 do 100 razy. Najwyższą liczebność bakterii stwierdzono w próbkach gleby pobieranej z głębokości 2 m (K III i X III).



Rys. 1. Liczebność jtk bakterii na czterech podstawowych, stosowanych w badaniach ilościowych podłożach stałych
Fig. 1. Number of CFU of bacteria on the four used in quantitative research, primary solid medium



Rys. 2. Liczebność jtk bakterii na dodatkowych czterech, stosowanych w badaniach ilościowych, podłożach stałych
Fig. 2. Number of CFU of bacteria on the four used in quantitative research, additional solid medium



Rys. 3. Skuteczność testów Petrifilm w odniesieniu do tradycyjnych podłoży stałych
 Fig. 3. The effectiveness of Petrifilm tests for the traditional solid medium

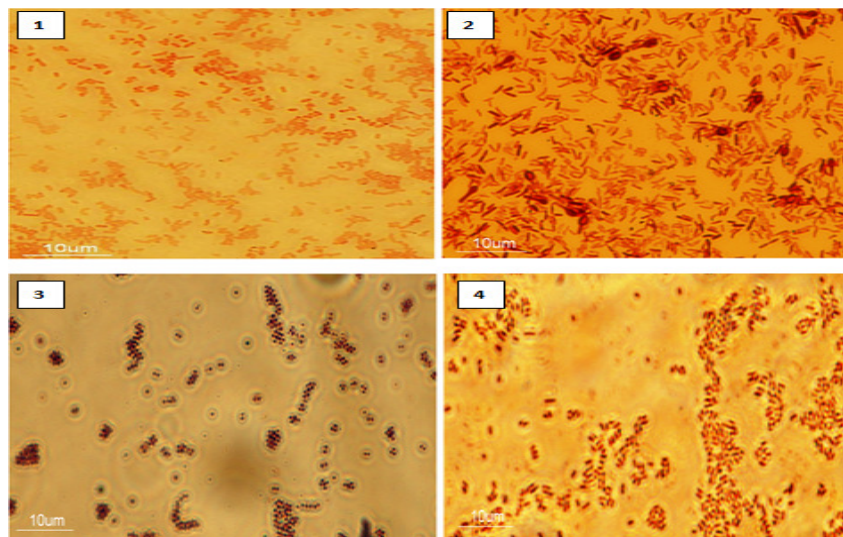
Z próbek ścieków i gleby wyizolowano i zidentyfikowano kilka gatunków bakterii o właściwościach chorobotwórczych, stanowiących potencjalne sanitarne zagrożenie. Uznano te bakterie za podstawowe wskaźniki mikrobiologiczne w badaniach (tab. 1).

Tab. 1. Gatunki bakterii (prawa kolumna) wykryte w pobranych próbkach gleby i ścieków (lewa kolumna), będące potencjalnymi wskaźnikami zagrożenia sanitarno-mikrobiologicznego

Tab. 1. Bacterial species (right column) detected in samples of soil and sewage (left column), which are potential indicators of sanitary-microbiological hazards

Próbka	Wyizolowane patogenne gatunki bakterii (potencjalne wskaźniki)
K I – K III	<i>Escherichia coli</i> - brak w K III; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> - brak w K II i K III; <i>Enterococcus faecalis</i> - brak w K II i K III
X I – X III	<i>Clostridium difficile</i> - brak w X II; <i>Escherichia coli</i> ; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; <i>Enterococcus faecalis</i> ; <i>Streptococcus uberis</i> ; <i>Staphylococcus aureus</i>
S	<i>Clostridium difficile</i> ; <i>Escherichia coli</i> ; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; <i>Enterococcus faecalis</i> ; <i>Streptococcus uberis</i> ; <i>Staphylococcus aureus</i>

Analiza wyników (tabela 1) potwierdza wyizolowanie i zidentyfikowanie z pobranych próbek 6 gatunków bakterii będących patogenami bądź potencjalnymi patogenami. Największe podobieństwo pod względem różnorodności tych bakterii występuje pomiędzy próbkami ścieków (S) oraz gleby z najbliższego sąsiedztwa zbiornika (X I – X III). W próbkach X I i X III gatunki te pokrywały się z tymi, które wyizolowano ze ścieków. Natomiast w próbce X II były obecne wszystkie bakterie poza *Clostridium difficile*. W próbkach kontrolnych (K I – K III) wykryto tylko 3 gatunki spośród tych bakterii, przy czym należy zaznaczyć, że w próbce K III nie było żadnego z nich, a w KII obecne były tylko bakterie *Escherichia coli*. Pod względem liczebności bakterii należących do tych gatunków, w próbkach X I – X III były one bardziej liczne niż w próbkach kontrolnych (K I – K III). Przykładowe obrazy bakterii uzyskane z preparatów mikroskopowych przedstawiono na fot. 1.



Fot. 1. Przykładowe zdjęcia uzyskane podczas obserwacji mikroskopowej (mikroskop NIKON Eclipse E600, powiększenie 1000x) preparatów bakterii wyhodowanych na zastosowanych podłożach: 1 - *Escherichia coli*, 2 - *Clostridium difficile*, 3 - *Staphylococcus aureus*, 4 - *Pseudomonas aeruginosa*

Phot. 1. Sample images obtained during observation microscope (NIKON Eclipse E600, extension 1000x) preparations of bacteria grown on used medium: 1 - *Escherichia coli*, 2 - *Clostridium difficile*, 3 - *Staphylococcus aureus*, 4 - *Pseudomonas aeruginosa*

PODSUMOWANIE

Zanieczyszczanie gleby i wód należy do jednego z głównych problemów związanych z gospodarowaniem powstających ścieków bytowo-gospodarczych. Zjawisko to jest czasami wynikiem przypadku, jednak znacznie częściej celowej działalności ludzkiej [Zadroga i in. 2001]. Problem jest szczególnie ważny, gdyż mamy tutaj do czynienia z bezpośrednim kontaktem ścieków z najbliższym otoczeniem człowieka. Dlatego istotnym elementem prowadzonych w tym zakresie badań, jest poszukiwanie wskaźników (w tym mikrobiologicznych) pozwalających na szybkie wykrywanie i usuwanie skutków skażeń. Do ilościowych wskaźników zaliczyć można hodowle prowadzone w kierunku oznaczania liczebności bakterii z rodziny *Pseudomonadaceae*, *Staphylococcaceae*, *Streptococcaceae*, *Enterobacteriaceae* [Bahig i in. 2008, Kobabe i in. 2004]. Zastosowanie w części przypadków, oprócz tradycyjnej metody Kocha, mogą znaleźć również testy Petrifilm, których skuteczność potwierdzono w badaniach. Jako wskaźniki jakościowe mogą służyć powszechne w ściekach oraz przewodach pokarmowych ludzi i zwierząt gatunki patogenów bakteryjnych, jak np. *Escherichia coli*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* czy *Clostridium difficile* [Kaźmierczuk i Kalisz 2010, Smyła i in. 2003]. Ich obecność potwierdzono w ściekach i glebie w pobliżu zbiornika bezodpływowego. Są to przeważnie bakterie chorobotwórcze, w większości również toksynogenne. Ich występowanie wynikające najprawdopodobniej z nieszczelności konstrukcji szamb i kanalizacji, może zagrażać zdrowiu mieszkańców.

LITERATURA

1. BAHIG A.E., ALY E.A., KHALED A.A., AMEL K.A., *Isolation, characterization and application of bacterial population from agricultural soil at Sohag Province, Egypt*. *Malaysion Journal of Microbiology*, 4, (2), 42-50, 2008
2. BŁASZCZYK M.K.: *Mikroorganizmy w ochronie środowiska*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 40-50, 2007
3. BŁASZCZYK M.K.: *Mikrobiologia środowisk*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 339-343, 2010
4. CYPROWSKI M., KRAJEWSKI J.A.: *Czynniki szkodliwe dla zdrowia występujące w oczyszczalniach ścieków komunalnych*. *Medycyna Pracy*, Nr 54, 1, 73-80, 2003
5. DE VOS P., GARRITY G.M., JONES D., KRIEG N.R., LUDWIG W., RAINEY F.A., SCHLEIFER K-H., WHITMAN W.B.: *Bergey's Manual of*

- Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes*. Second Edition. Springer, Nowy York, 21-114, 392-401, 594-602, 655-673, 738-772, 2009
6. GOŁOFIT-SZYMCZAK M., ZAPÓR L.: *Zagrożenia biologiczne w oczyszczalniach ścieków komunalnych*. Bezpieczeństwo Pracy, Nr 3, 26-28, 2007
 7. KAŹMIERCZUK M., KALISZ L., *Bakterie hemolizujące proponowanym wskaźnikiem skuteczności higienizacji wapnem komunalnych osadów ściekowych*. Ochrona Środowiska i Zasobów Naturalnych, 42, 183-191, 2010
 8. KOBABE S., WAGNER D., PFEIFFER E.M., *Characterisation of microbial community composition of a Siberian tundra soil by fluorescence in situ hybridisation*. FEMS Microbiology Ecology, 50, 13-23, 2004
 9. MAUKONEN J., MÄTTÖ J., SUIHKO M-L., SAARELA M.: *Intra-individual diversity and similarity of salivary and faecal microbiota*. Journal of Medical Microbiology, Nr 57, 1560-1568, 2008
 10. ROMDHANA M.H., LECOMTE D., LADEVIE B., SABLAYROLLES C.: *Monitoring of pathogenic microorganisms contamination during heat drying process of sewage sludge*. Process Safety and Environmental Protection, Nr 87, 377-386, 2009
 11. SMYŁŁA A., PIOTROWSKA-SEGET Z., TYFLEWSKA A., *Pathogenic bacteria hazard in surface waters*. AUMC Limnological Papers, Toruń, XIII, 110, 159-169, 2003
 12. STALEY J.T, BOONE D.R., BRENNER D.J., DE VOS P., GARRITY G.M., GOODFELLOW M., KRIEG N.R., RAINEY F.A., SCHLEIFER K-H.: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 2: The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria*. Second Edition. Springer, Nowy York, 323-358, 607-624, 2005
 13. TOZE S.: *PCR and the detection of microbial pathogens in water and wastewater*. Water Research, Nr 33, 17, 3545-3556, 1999
 14. ZADROGA B., OLAŃCZUK-NEYMAN K., *Ochrona i rekultywacja podłoża gruntowego*. Gdańsk: Wydawnictwo PGdań, 226, 2001
 15. ZAMORSKA J.: *Organizmy patogenne w osadach ściekowych*. Polskie Towarzystwo Gleboznawcze, Oddział w Rzeszowie, Zeszyty Naukowe, Nr 9, 91-98, 2007

MICROBIOLOGICAL INDICATORS FOR SANITARY SOIL CONTAMINATION NEAR LEAKING CESSPOOL

S u m m a r y

The main purpose of this thesis was to determine the microbiological indicators confirm that the phenomenon of leakages cesspool, contamination of nearby soil by municipal sewage. In the sewage samples and the soil were isolated and identified several species of bacteria, representing a potential health hazard: Escherichia coli, Enterococcus faecalis, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Clostridium difficile, Streptococcus uberis.

Key words: municipal sewage, cesspool, microbiological indicators,
pathogenic bacteria, soil