

Marcin Kaźmierczuk*, Liliana Kalisz*

**BAKTERIE HEMOLIZUJĄCE PROPONOWANYM WSKAŹNIKIEM
SKUTECZNOŚCI HIGIENIZACJI WAPNEM KOMUNALNYCH OSADÓW
ŚCIEKOWYCH**

**BACTERIA WITH HEMOLYTIC ACTIVITY AS PROPOSAL INDICATOR
OF EFFECTIVENESS HIGIENIZATION BY LIME OF MUNICIPAL
SEWAGE SLUDGES**

Słowa kluczowe: komunalne osady ściekowe, higienizacja, wapnowanie, kryteria kontroli sanitarnej, bakterie hemolizujące, metoda wykrywania bakterii hemolizujących w wapnowanych osadach ściekowych.

Key words: municipal sewage sludges, higienization, liming, sanitary criteria, bacteria with hemolytic activity, method for identifying the presence of hemolytic bacteria in limed municipal sewage sludges.

Hemolytic, heterotrophic bacteria which are varied in terms of their phenotypes and genotypes are one of the groups of bacteria commonly found in limed municipal sewage sludges. So phenomenon of hemolysis can be a methodical basis for isolation and detection of presence of this group of pathogenic, potentially pathogenic and opportunistic bacteria, other than Salmonella spp. on culture medium. According to this, feature has been used to develop a simple and rapid method for detecting this group of bacteria. In paper, has been presented a proposal of a qualitative sanitary test based on the examination of the presence of hemolytic bacteria in limed municipal sewage sludges. This test allows detect pathogenic bacteria other than Salmonella spp. in the examined sample. This bioindicator would extend the range of the existing control criteria, pursuant to the Regulation of the Minister of the Environment from 2002, for admission of municipal sewage sludge for its use to land.

* Dr Marcin Kaźmierczuk, prof. dr hab. Liliana Kalisz – Zakład Technologii Ścieków i Biologii Sanitarnej, Instytut Ochrony Środowiska, ul. Kolektorska 4, 01-692 Warszawa;
kontakt: tel. 22 833 42 41 wew.38, e-mail: marcin.kazmierczuk@ios.edu.pl

1. WPROWADZENIE

W ostatnich latach obserwuje się stały wzrost ilości osadów. Należy przyjąć, że ta tendencja wzrostowa będzie utrzymywała się nadal, ponieważ liczba nowo oddawanych do eksploatacji obiektów będzie się stale zwiększała. Prognoza jakości osadów ściekowych przewiduje, że istniejące sposoby ich unieszkodliwiania zostaną utrzymane przy jednoczesnym podjęciu dalszych starań o zwiększenie kontroli sanitarnej osadów wykorzystywanych do celów rolniczych. Kontrolne badania sanitarne zarówno osadów, jak i produktów ich przetworzenia, nabierają szczególnie dużego znaczenia, ponieważ w „Krajowym Planie Gospodarki Odpadami 2010” założono, że ilość osadów kompostowanych może się zwiększyć nawet do 20% całkowitej ich masy. Jednocześnie, zgodnie z przepisami WE, zmniejszy się strumień odpadów biodegradowalnych kierowanych dotychczas na składowiska odpadów komunalnych [Working Document on Sludge 2000].

Agrotechniczne wykorzystywanie komunalnych osadów ściekowych zarówno surowych, jak i przefermentowanych, stabilizowanych tlenowo, wapnowanych i kompostowanych, jest w wielu krajach preferowanym, szeroko stosowanym sposobem rozwiązania problemu recyklingu osadów ściekowych [Lepeople i in. 2004]. Podstawowym jednak warunkiem jest zapewnienie bezpieczeństwa przy ich stosowaniu. Czynniki zwiększającymi ryzyko, ograniczającymi ten sposób wykorzystania osadów, jest ich skład, a zwłaszcza zawartość związków organicznych, często o mutagennym, rakotwórczym lub teratogennym działaniu, wysokie stężenie metali oraz obecność skażeń biologicznych: bakterii, wirusów, grzybów strzępkowych, drożdży i grzybów drożdżopodobnych, pierwotniaków oraz pasożytów jelitowych ludzi i zwierząt [EPA/625/10-89/006 1989, Dumontet i in. 2001, Gantzer i in. 2001, Lepeople i in. 2004].

Mikroorganizmy chorobotwórcze, takie jak bakterie lub wirusy, występują w osadach w formie wegetatywnej, bezpośrednio zagrażając zdrowiu człowieka, zwierzęcia lub rośliny, ale mogą także występować w różnych formach przetrwalnych, jak spory bakterii lub zarodniki grzybów, cysty i oocysty pierwotniaków lub jaja pasożytów przewodu pokarmowego ludzi i zwierząt.

Osady, zarówno ze względu na skład fizyczny, jak i chemiczny, oraz na obecność różnych chorobotwórczych organizmów, są niezwykle heterogennym materiałem, potencjalnie niebezpiecznym również z sanitarno-epidemiologicznego punktu widzenia. Ze względu na skład i związane z nim właściwości stanowić mogą poważne zagrożenie środowiska glebowego i zdrowia ludności, ponieważ są dobrym substratem do namnażania różnych mikroorganizmów, w tym grzybów strzępkowych, drożdżaków i grzybów drożdżopodobnych oraz bakterii.

Na podstawie danych przytoczonych w piśmiennictwie oraz wyników badań własnych można stwierdzić, że przeróbka osadów ściekowych jest mało skuteczna z sanitarnego punktu widzenia i osady po przeróbce i unieszkodliwianiu na drodze mezofilowej fermentacji

tacji beztlenowej lub tlenowej stabilizacji zawierają nadal znaczącą liczbę różnych bakterii, w tym również bakterie chorobotwórcze, potencjalnie chorobotwórcze oraz oportunistyczne, groźne dla człowieka. W wykazie mikroorganizmów chorobotwórczych spotkanych w osadach ściekowych, sporządzonym na podstawie wyników badań Carringtona [2001] i Straucha [1998] wymienionych jest 15 typów wirusów, 27 gatunków bakterii, 12 gatunków grzybów, 10 gatunków pierwotniaków i 13 gatunków pasożytów przewodu pokarmowego ludzi i zwierząt [Lepeuple i in. 2004]. Obecność w osadach ściekowych oraz nawozach organiczno-mineralnych i kompostach tak licznych i różnorodnych czynników szkodliwych może doprowadzić do wystąpienia różnych niekorzystnych skutków zdrowotnych, zarówno bezpośrednio przez skażenie biologiczne gleby, produktów rolnych i wód podskórnych, jak i jako bioaerozol, przenoszony drogą powietrzno-pyłową (powietrzno-kropelkową).

W niniejszym artykule przedstawiono wyniki badań, których celem jest opracowanie wskaźnika sanitarnej jakości osadów ściekowych opartego na obecności Jednostek Tworzących Kolonie – JTK, z hemolizą typu beta. Stanowi to propozycję rozszerzenia zakresu sanitarnych kryteriów kontrolnych stosowanych obecnie przy dopuszczaniu osadów ściekowych do ich rolniczego wykorzystania, zgodnie z rozporządzeniem Ministra Środowiska [Rozporządzenie... 2002] biorących pod uwagę jedynie obecność pałeczek *Salmonella* sp. Bakterie te jednak ze względu na przystosowanie do miejsca ich bytowania, którym jest głównie przewód pokarmowy ludzi oraz zwierząt, są specyficznymi fizjologicznie drobnoustrojami szczególnie wrażliwymi na środowisko alkaliczne ($\text{pH} > 10$). Z tego powodu nie mogą być reprezentantem dla innych bakterii chorobotwórczych, również obecnych w osadach ściekowych i groźnych dla człowieka lub zwierząt, ale niereagujących na alkaliczne środowisko. Ponadto żaden pojedynczy mikroorganizm, nawet najbardziej chorobotwórczy, nie jest w stanie pełnić roli biowskaźnika możliwości występowania w badanej próbce innych mikroorganizmów, równie groźnych dla zdrowia człowieka. Dlatego wydaje się, że branie pod uwagę w badaniach kontrolnych tylko jednego organizmu wskaźnikowego nie jest wystarczające, aby na jego podstawie skutecznie przewidywać rozmiar ryzyka zdrowotnego, ze względu na obecność w osadach ściekowych również innych patogenów. Słuszne jest zatem, aby rolę tę pełniły różne mikroorganizmy, odznaczające się zróżnicowaną odpornością i zarazem spełniające kryteria określone w odniesieniu do mikroorganizmów wskaźnikowych [Kaźmierczuk, Kalisz 2008].

Ponieważ nie jest możliwe wyhodowanie i zidentyfikowanie wszystkich mikroorganizmów chorobotwórczych, które mogą być obecne w osadach ściekowych, proponuje się, aby obok pałeczek *Salmonella*, jako mikroorganizmy wskaźnikowe wprowadzić bakterie hemolizujące. Przez określenie „bakterie hemolizujące” należy rozumieć wszystkie bakterie, które posiadają zdolność wywoływania hemolizy krwinek ssaków, np. baranich, na odpowiednim podłożu hodowlanym (obecność JTK z hemolizą typu beta). W ten sposób bakterie te jako zbiorowy wskaźnik biologiczny przez swoją obecność w badanej próbce informowałyby o stanie higieny osadów ściekowych.

2. BADANIA I ICH WYNIKI

Badania wykonano w dwóch etapach, w I etapie na osadach z 8 oczyszczalni ścieków oraz w II etapie z 4 oczyszczalni ścieków. Badania te wykonano jako dodatkowe, obok rutynowej kontroli sanitarnej zgodnej z rozporządzeniem Ministra Środowiska w sprawie komunalnych osadów ściekowych [2002], obejmującej wykrycie pałeczek *Salmonella*.

Do wykrywania JTK bakterii hemolizujących w osadach ściekowych, wybrano agar wzbogacony, zawierający 5-procentowy dodatek baranich czerwonych krwinek, o nazwie handlowej Columbia (bioMerieux). Posiew wykonywano techniką redukcyjnego posiewu powierzchniowego, z próbek zawiesiny osadów ściekowych przygotowanej w zawierającym 0,1-procentowy dodatek Tweenu 80 buforze fosforanowym o wartości pH 7,3, zgodnie z procedurą podaną w załączniku 1, zamieszczonym na końcu artykułu. Wzrost bakterii hemolizujących, wywołujących hemolizę typu beta lub alfa jest łatwy do zaobserwowania makroskopowo (okiem nieuzbrojonym), w postaci charakterystycznej strefy, wyraźnie jaśniejszej w porównaniu do pozostałej nieprzezroczystej powierzchni podłoża lub zazielenienia podłoża.

Proces wykrywania w próbce obecności bakterii *Salmonella* sp. polegał na:

- 1) wstępnym przednamnożeniu ogólnym zawiesiny próbki w buforze fosforanowym podczas 24-godzinnej inkubacji, w temperaturze 37°C;
- 2) namnożeniu ogólnym bakterii w podłożu płynnym BWP-F, zaszczerpionym zawiesiną z buforu fosforanowego, podczas 24-godzinnej inkubacji, w temperaturze 37°C;
- 3) namnożeniu wybiórczym bakterii w bulionie RVS-T, zaszczerpionym zawiesiną z BWP-F, podczas 24-godzinnej inkubacji w temperaturze 43°C;
- 4) posiewie powierzchniowym zawiesiny z RVS-T na podłoże stałe XLD i SM ID2;
- 5) potwierdzeniu przynależności do rodzaju *Salmonella* wyhodowanych JTK na podłożach stałych za pomocą identyfikacyjnego testu biochemicznego API RapiD (BioMerieux).

W pierwszym etapie pracy zbadano 32 próbki osadów ściekowych stabilizowanych tlenowo, pobrane przed wapnowaniem i pochodzące z 8 oczyszczalni ścieków, pod kątem obecności w nich bakterii *Salmonella* sp. oraz bakterii hemolizujących typu beta.

Do drugiego etapu wybrano wapnowane osady tylko z tych oczyszczalni, które spełniały następujące warunki:

- 1) prowadzono rutynową higienizację w skali technicznej za pomocą wapna;
- 2) stwierdzono obecności bakterii *Salmonella* sp. i bakterii hemolizujących typu beta w osadach przed higienizacją.

We wszystkich próbkach osadów przed higienizacją stwierdzono obecność bakterii hemolizujących typu beta, obecność zaś bakterii *Salmonella* sp. tylko w próbkach pochodzących z 4 oczyszczalni. Tym samym przeprowadzone badania potwierdziły wcześniejsze wyniki, że bakterie *Salmonella* sp., będące kryterium sanitarnym zgodnie z rozporządzeniem Ministra Środowiska z 2002 r., występują w krajowych osadach ściekowych bardzo rzadko.

Do II etapu badań wybrano wapnowane osady spełniające założone warunki. W tym etapie badania wykonano w 12 próbkach wapnowanych osadów, stabilizowanych tlenowo, pochodzących z 4 oczyszczalni (tab. 1).

Tabela 1. Wyniki badań wapnowanych osadów ściekowych

Table 1. The results of analysis of limed municipal sewage sludges

Oczyszczalnia Ścieków	Seria badań	pH	Temperatura	<i>Salmonella</i> sp.	Bakterie hemolizujące
Teresin	I	11,2	otoczenia	nieobecne	obecne
	II	8,2	otoczenia	obecne	obecne
	III	12,2	otoczenia	nieobecne	obecne
		9,5	otoczenia	obecne	obecne
		10,6	otoczenia	nieobecne	obecne
Łomianki	I	7,7	otoczenia	obecne	obecne
	II	8,3	otoczenia	obecne	obecne
	III	7,6	otoczenia	obecne	obecne
		8,8	otoczenia	obecne	obecne
Józefów	I	9,6	otoczenia	obecne	obecne
	II	9,8	otoczenia	obecne	obecne
	III	9,4	otoczenia	obecne	obecne
Falenty	I	11,7	ok. 55°C	nieobecne	nieobecne
	II	11,4	ok. 55°C	nieobecne	nieobecne
	III	11,5	ok. 55°C	nieobecne	nieobecne
		11,2	ok. 55°C	nieobecne	nieobecne
		11,5	otoczenia	nieobecne	obecne

Uzyskane wyniki badań wskazują, że w osadach ściekowych higienizowanych wapnem, o pH>10, są obecne bakterie hemolizujące typu beta. Świadczy to, że wapnowane osady uznane, zgodnie z kryteriami biologicznymi kontroli sanitarnej, za bezpieczne z sanitarnego punktu widzenia z powodu braku w nich pałeczek *Salmonella* sp., mogą stwarzać zagrożenie sanitarno-higieniczne dla środowiska ze względu na obecność w nich innych niż *Salmonella* sp. bakterii chorobotwórczych, potencjalnie chorobotwórczych lub oportunistycznych.

3. ANALIZA WYNIKÓW BADAŃ I PODSUMOWANIE

Sanitarne właściwości osadów ściekowych zależą od wielu czynników, między innymi takich, jak standard życia, poziom higieny lub stan zdrowia mieszkańców terenu obsługiwanej przez daną oczyszczalnię ścieków. Nieodnotowanie większych problemów zdrowotnych bezpośrednio związanych z rolniczym wykorzystywaniem osadów ściekowych nie zmniejsza wcale ryzyka zagrożenia środowiska tymi osadami powodowanego przez czynniki pochodzenia biologicznego.

Na podstawie wyników badań własnych oraz danych z piśmiennictwa stwierdza się, że wiele mikroorganizmów chorobotwórczych lub oportunistycznych przeżywa mezofilową fer-

mentację beztlenową oraz tlenową stabilizację, które są stosowane jako procesy przeróbki i unieszkodliwiania osadów ściekowych. Zmniejszeniu ulega jedynie ich liczba [Dumontet i in. 2001]. Dlatego w większości krajów europejskich stosujących wymóg kontroli sanitarnej osadów ściekowych rzadko uwzględnia się pojedynczy mikroorganizm wskaźnikowy. Przeważnie obowiązujące oraz projektowane kryteria sanitarne obejmują kilka mikroorganizmów wskaźnikowych, a do najczęściej stosowanych należą [Lepeuple i in. 2004]:

- 1) ogólna liczba bakterii grupy coli oraz coli typu fekalnego,
- 2) *Escherichia coli*,
- 3) *Enterococcus*, *Clostridium*,
- 4) rodzina *Enterobacteriaceae*, a wśród nich *Salmonella*.

W Polsce obowiązek badania osadów ściekowych przeznaczonych do rolniczego wykorzystania został nałożony rozporządzeniem Ministra Środowiska w sprawie komunalnych osadów ściekowych [Rozporządzenie... 2002]. W rozporządzeniu tym, bakteriologicznym wskaźnikiem sanitarnym jest obecność bakterii *Salmonella* sp. Bakteria ta jest bakterią przeważnie bytującą w przewodzie pokarmowym i głównie z nią są związane choroby przewodu pokarmowego, a jej obecność świadczy o fekalnym pochodzeniu biologicznego skażenia [Zaremba, Borowski 2002]. Powoduje to, że brany jest pod uwagę tylko wąski zakres skażeń biologicznych pochodzących z przewodu pokarmowego ludzi i/lub zwierząt, a to poważnie zwiększa ryzyko wystąpienia innych chorób infekcyjnych pomimo stwierdzenia braku tych bakterii w badanej próbce osadu. Na podstawie danych z piśmiennictwa oraz wyników badań własnych należy stwierdzić, że bakterie *Salmonella* sp. występują w osadach ściekowych w wyraźnie mniejszej liczebności (2–24 JTK) w porównaniu do liczebności innych bakterii, np. z grupy coli *Escherichia coli*, *Streptococcus* typu fekalnego czy *Staphylococcus*, szacowanej na poziomie 10^5 – 10^6 JTK. Ponadto w warunkach laboratoryjnych zawsze wykrywa się tylko niewielką część mikroflory kolonizującej osad ściekowy. Z badanej próbki izoluje się jedynie te bakterie, które są zdolne do utworzenia kolonii w sztucznie stworzonych warunkach (*in vitro*), różniących się od występujących w naturalnym środowisku ich bytowania, tj. *in vivo*.

Z doświadczeń własnych wynika także, że wykrywalność bakterii *Salmonella* sp. w osadach jest stosunkowo trudna i dodatkowo cechuje ją przypadkowość. W jednej próbce można wykryć obecność tych bakterii, a w innej próbce z tej samej partii materiału stwierdzić ich brak.

Przyczyną niewykrycia pałeczek *Salmonella* sp. może być także specyficzny stan osłabienia fizjologicznego tych bakterii, określane jako VBNC (ang. Viable But Not Culturable), w znacznym stopniu utrudniający badanie tradycyjną metodą hodowlaną. Prawdopodobnie, ze względu na niewielką liczebność bakterii *Salmonella* sp., w próbkach osadów pochodzących z krajowych oczyszczalni ścieków są one wykrywane stosunkowo rzadko. Z tego właśnie powodu, aby uniknąć błędów, w prezentowanych w niniejszej pracy badaniach zastosowano opracowaną w Instytucie Ochrony Środowiska procedurę wykrywania bakterii *Salmonella* sp. w próbkach osadu ściekowego, wprowadzając obligatoryjny etap wstępny, polegający na przednamnożeniu ogólnym [Kaźmierczuk, Kalisz 2007, 2008]. Etap ten jest bardzo ważny, ponieważ negatywny rezul-

tat badań bakteriologicznych osadu, którego przyczyną może być zarówno rzeczywisty brak bakterii *Salmonella* sp., jak również bardzo mała ich liczba w próbce (poniżej progu wykrywalności), jest jedynym bakteriologicznym kryterium, umożliwiającym dopuszczenie do wykorzystania komunalnych osadów ściekowych w gruncie (rolnictwo, rekultywacja, dostosowanie do potrzeb wynikających z planów lub decyzji, uprawa roślin przeznaczonych do produkcji kompostu oraz uprawa roślin nieprzeznaczonych do spożycia i produkcji pasz).

Paleczki *Salmonella* sp. są jednymi z wielu mikroorganizmów chorobotwórczych i ich niestwierdzenie w badanej próbce osadu nie oznacza braku obecności w tej próbce innych bakterii chorobotwórczych lub oportunistycznych, równie groźnych jak *Salmonella* sp. dla człowieka lub zwierząt.

Jedną z grup bakterii występujących w osadach ściekowych są bakterie heterotroficzne, posiadające fizjologiczną zdolność hemolizy zupełnej, tzw. hemolizy beta. Hemoliza jest zjawiskiem polegającym na niszczeniu (lizie) czerwonych krwinek (erytrocytów) w bezpośrednim kontakcie z bakteriami produkującymi białkowe lub peptydowe toksyny cytolityczne, tzw. cytolizyny, a z powodu ich właściwości hemolitycznych, często nazywanych hemolizynami. Zjawisko to, jest cechą fizjologiczną występującą u różnych bakterii. Wiele z nich ma duże znaczenie kliniczne [Holt i in. 1994, Zaremba, Borowski 2002]. Chociaż należą one do różnych rodzajów, a nawet rodzin, pod względem tej unikatowej cechy fizjologicznej stanowią jednolitą grupę, łatwo odróżniającą się od pozostałych bakterii.

Na podstawie uzyskanych wyników można więc przyjąć, że stwierdzenie obecności lub braku JTK bakterii hemolizujących typu beta na określonym identyfikacyjnym podłożu hodowlanym **może stanowić podstawę metodyczną możliwości wyodrębnienia i wykrycia tej grupy bakterii w badanym osadzie ściekowym na podstawie wyniku szybkiego testu skringowego**. Cechę tę wykorzystano do opracowania prostej i szybkiej jakościowej metody wykrywania tej grupy bakterii.

Przez wprowadzenie nowego wskaźnika bakteriologicznego, którego podstawą jest wykrycie w próbce osadu ściekowego obecności bakterii chorobotwórczych innych niż *Salmonella* sp., zwiększy się skuteczność kontroli higienizacji poprzez wapnowanie osadów ściekowych.

4. WNIOSKI

1. Na podstawie wizji lokalnych oraz informacji udzielonych przez pracowników oczyszczalni odpowiedzialnych za wapnowanie stwierdzono, że w higienizacji osadów stosuje się częściej wapno gaszone niż palone.
2. Badania wykazały obecność bakterii hemolizujących typu beta w wapnowanych osadach ściekowych o pH>10. Na szczególną uwagę zasługuje wykrycie bakterii hemolizujących w osadach o pH>10, w których nie stwierdzono bakterii *Salmonella* sp.
3. Obecność bakterii hemolizujących typu beta w osadach bezpiecznych z sanitarnego punktu widzenia ze względu na brak w nich bakterii *Salmonella* jest wskaźnikiem nie-

skutecznej higienizacji, nawet pomimo uzyskania wartości $\text{pH} > 10$, i może sugerować, że w procesie wapnowania, z różnych przyczyn, nie uzyskano odpowiednio wysokiej temperatury niezbędnej do uzyskania efektu higienizacji.

4. Negatywny wynik badania obecności bakterii *Salmonella* sp. może być spowodowany jedynie przez wysoką wartość $\text{pH} > 10$, która jest szczególnie dla tych bakterii czynnikiem biobójczym.

W prezentowanym artykule przedstawiono propozycję jakościowego testu sanitarnego polegającego na stwierdzeniu obecności bakterii hemolizujących typu beta w wapnowanych osadach ściekowych (zał. 1). Test ten umożliwi wykrycie w badanym materiale obecności innych niż *Salmonella* sp. bakterii chorobotwórczych, potencjalnie chorobotwórczych oraz oportunistycznych.

Wykrywanie hemolizy jest szybkie i proste dzięki temu, że wykrywa się jedną cechę pozwalającą jednoznacznie wyróżnić te bakterie. Jakościowy test sanitarny, polegający na wykryciu w osadach ściekowych bakterii hemolizujących, należy traktować jako propozycję, wymagającą jednak prowadzenia dalszych badań potwierdzających. Po potwierdzeniu uzyskanych wyników proponowany test mógłby obejmować szerszy zakres wskaźników biologicznych w kontrolnych badaniach sanitarnych osadów ściekowych, dopuszczających je do rolniczego wykorzystania. Powinno się to przyczynić do zmniejszenia ryzyka chorób infekcyjnych, spowodowanego wprowadzeniem do gleby osadów ściekowych, zawierających biologiczne czynniki szkodliwe i przez to niebezpiecznych z sanitarnego punktu widzenia.

PIŚMIENICTWO I AKTY PRAWNE

- Control of Pathogens in Municipal Wastewater Sludge.** 1989. EPA/625/10-89/006 ENVIRONMENTAL REGULATIONS AND TECHNOLOGY.
- DUMONTET S., SCOPA A., KERJE S., KROVACEK K. 2001. The Importance of Pathogenic Organisms in Sewage and Sewage Sludge Air and Waste Manage. Assoc. 51. 848–860.
- GANTZER C. GASPARD F., GALVEZ L., HUYARD A., DUMOUTHIER N., SCHWARTZBROD J. 2001. Monitoring of bacterial and parasitological contamination during various treatment of sludge. Wat. Res. 16: 3763–3770.
- HOLT J.G., KRIEG N.R., SNEATH P.H.A., STALEY J.T., WILLIAMS S.T. 1994. Bergeys Manual of Determinative Bacteriology Ninth. Ed. Lippincott Williams & Wilkins.
- KAŹMIERCZUK M., KALISZ L. 2007. Opracowanie podstaw do rozszerzenia kryteriów biologicznych o nowy wskaźnik bakteriologiczny kontroli sanitarnej osadów ściekowych pod kątem ich przyrodniczego wykorzystania. IOŚ, Warszawa; maszynopis.
- KAŹMIERCZUK M., KALISZ L. 2008. A Proposal for Extending Biological Criteria Applied in Sanitary Control of Sewage Sludge Intended for Agricultural Use. Polish J. of Environmental Studies 17 (5).

- Krajowy plan gospodarki odpadami 2010.** 2006. Ministerstwo Środowiska, Warszawa.
- LEPEUPLE A.S., GAVAL G., JOVIC M., DE ROUBIN M.R. 2004. Horizontal 6 WP-3 Literature review on levels of pathogens and abatements of them in the field of sludge, soil and treated biowastes. Hygienic parameters; www.ecn.nl/docs/society/horizontal/hor6_pathogens.pdf
- Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 27 sierpnia 2002r. W sprawie komunalnych osadów ściekowych.** Dz.U. 2002r. Nr 134, poz. 1140.
- TC 308 WI 059:2005 (E).
- Working document on sludge.** 2000. 3 Draft. Brussels ENV.E.3/LM 27, April 2000
- ZAREMBA M.L., BOROWSKI J. 2002. Mikrobiologia Lekarska. Wyd. Lekarskie PZWL, Warszawa.

ZAŁĄCZNIK 1

Metoda jakościowego wykrywania bakterii hemolizujących typu beta w komunalnych osadach ściekowych wapnowanych

Bakterie hemolizujące typu beta mogą być wskaźnikiem stanu sanitarnego wapnowanych osadów ściekowych. Stwierdzenie obecności tych bakterii w badanej próbce jest dowodem nieskutecznej higienizacji i stanowi jednocześnie informację o istnieniu innych zagrożeń zdrowotnych niż spowodowanych obecnością bakterii *Salmonella* sp.

Metoda

Metoda polega na makroskopowym stwierdzeniu obecności JTK z hemolizą typu beta na podłożu hodowlanym w wyniku posiewu powierzchniowego zawiesiny badanego materiału. Wzrost bakterii hemolizujących w postaci JTK jest łatwy do zaobserwowania. Otoczone strefą hemolizy typu beta JTK są wyraźnie widoczne i łatwe do odróżnienia na tle jednolicie matowego i nieprzezroczystego podłoża hodowlanego zawierającego baranie erytrocyty.

Sposób postępowania:

- 1) ujednorodnienie struktury badanej próbki wapnowanego osadu ściekowego przez jej rozdrobienie lub homogenizację,
- 2) przygotowanie zawiesiny badanej próbki w buforze fosforanowym zgodnie z [Kaźmierczuk M., Kalisz L. 2007],
- 3) wykonanie posiewu powierzchniowego za pomocą ezy na podłożu COLUMBIA, zawierające 5 procentowy dodatek baranich erytrocytów,
- 4) inkubacja posianych płytek przez 24 godziny w temperaturze 37°C,
- 5) odczytanie obecności lub braku charakterystycznych „tysinek” w podłożu, czyli JTK z hemolizą typu beta.

Uwaga ogólna: jako wynik dodatni testu uznaje się obecność tylko JTK z hemolizą typu beta o cechach morfologicznych kolonii pochodzenia bakteryjnego