

Marcin Kaźmierczuk*

**METODA IZOLOWANIA I IDENTYFIKACJI BAKTERII *SALMONELLA* SP.
W KOMUNALNYCH OSADACH ŚCIEKOWYCH**

**THE METHOD OF INSULATION AND IDENTIFICATION OF
SALMONELLA SPP IN MUNICIPAL SEWAGE SLUDGES**

Słowa kluczowe: *Salmonella* sp., przednamnażanie, namnażanie, komunalne osady ściekowe.

Key words: *Salmonella* spp., pre-enrichment, enrichment, municipal sewage sludges

Salmonella spp is pathogenic grammnegative rods which belongs to Enterobacteriaceae family. Gastroenteritis, which their caused, are serious epidemiologic problem. Proposal quality detection method (Presence/Absence) for bacteria the genus *Salmonella* contains five steps:

- 1) pre-enrichment and resuscitation in non selective medium,
- 2) enrichment in non selective medium,
- 3) enrichment in selective medium,
- 4) differentiation in solid medium,
- 5) confirmed test (biochemical and eventually serological which are based on slide agglutination).

Pre-enrichment and enrichment steps in non selective medium are indispensable because of small amount of *Salmonellae* rods in sample of sludge and especially because of possible sub-lethally bacteria stress.

1. WPROWADZENIE

Bakterie z rodzaju *Salmonella* należące do rodziny Enterobacteriaceae są zaliczane do bezwzględnie chorobotwórczych. Wszystkie serotypy *Salmonella* sp., nawet tzw. odzwierzęce, są groźne dla człowieka – powodują niezbyt żołądka i jelit, czyli tzw. zatrucia pokarmo-

* Dr Marcin Kaźmierczuk – Zakład Technologii Ścieków i Biologii Sanitarnej, Instytut Ochrony Środowiska, ul. Kolektorska 4, 00-548 Warszawa; tel.: 22 833 42 41, wew. 38; e-mail: marcin.kazmierczuk@ios.edu.pl

we. Z punktu widzenia ich chorobotwórczości u ludzi pałeczki należące do serotypu *Salmonella typhi* wywołują dur brzuszny, należące do serotypu *S. paratyphi* A, B lub C, wywołują dury rzekome, a pozostałe serotypy (wg schematu budowy antygenowej Kauffmana White około 2500) są przyczyną chorób zakaźnych, określanych ogólną nazwą salmonelozy. Bakterie *Salmonella* sp. nie wytwarzają ektotoksyn, a chorobotwórcze działanie pałeczek durowych i rzekomodurowych jest związane z obecnością u tych drobnoustrojów endotoksyny w postaci wielkocząsteczkowego kompleksu polisacharydowo-lipidowo-polipeptydowego, zwanego glikolipidem lub lipopolisacharydem (LPS), i złożonego ze swoistego wielocukru, lipidu i niebiałkowego związku azotowego.

W rozporządzeniu Ministra Zdrowia z dnia 22 kwietnia 2005 r. w sprawie szkodliwych czynników biologicznych dla zdrowia w środowisku pracy oraz ochrony zdrowia pracowników zawodowo narażonych na te czynniki, bakterie *Salmonella* sp. są zakwalifikowane do 2 i 3 grupy zagrożenia.

W sklasyfikowanym przez CDC (Center for Disease Control and Prevention) wykazie niebezpiecznych drobnoustrojów oraz czynników biologicznych (broni biologicznej) mogących mieć zastosowanie do celów bioterrorystycznych są wymienione jako kategoria B. W kategorii tej występują bakterie patogenne, które charakteryzuje umiarkowanie łatwa rozsiewalność, umiarkowana zachorowalność oraz niska śmiertelność. Bakterie *Salmonella* sp. są wymienione obok takich, jak: *Shigella* sp., *Escherichia coli* O157:H7, *Brucella* sp., *Burkholderia (Pseudomonas) pseudomallei*, *Coxiella burnetti*, *Staphylococcus* sp., *Vibrio cholerae*.

Bakterie *Salmonella* sp. są także wymienione na liście środków biologicznych już wykorzystywanych przez grupy bioterrorystyczne.

Bakterie *Salmonella* sp. należą do bakterii szczególnie wybrednych, co powoduje, że ich wykrywanie jest związane z trudnościami warsztatowymi wymagającymi dużego doświadczenia oraz stosowania technik namnażających, zwiększających szanse wykrycia tych bakterii. Chociaż bakterie *Salmonella* sp. stosunkowo często występują w środowisku, ich liczebność w próbce może być mała. W badanym materiale mogą występować bakterie osłabione fizjologicznie lub nawet subletalnie częściowo uszkodzone na skutek procesów przeróbki i unieszkodliwiania osadów ściekowych, tzw. VBNC. Z tego powodu, jeżeli istnieje przypuszczenie, że próbka może być zanieczyszczona w niewielkim stopniu, często poniżej poziomu wykrywalności, procedura wykrywania bakterii *Salmonella* sp. musi obejmować przednamnażanie ogólne. Polega to na 24-godzinnej inkubacji zawiesiny osadu ściekowego w temperaturze pokojowej, w buforze fosforanowym, w którym następuje regeneracja komórek uszkodzonych oraz zwiększenie liczebności bakterii przez ich uwolnienie od cząstek osadu ściekowego. Ponadto, podczas badania osadów wapnowanych następuje neutralizacja badanego środowiska. Wykrywanie bakterii *Salmonella* sp. w próbkach komunalnych osadów ściekowych jest poważnie utrudnione ze względu na występowanie w nich bakterii towarzyszących, takich jak *Escherichia coli*, *Enterococcus* sp., czy też innych bakterii po-

wszechnie występujących w środowisku glebowym, np. *Citrobacter* i *Proteus*, których obecność i znacznie większa liczba przeszkadza w wykrywaniu wolniej rosnących *Salmonella* sp.

Ponieważ tzw. dawka infekcyjna bakterii *Salmonella* sp. dla człowieka – MID (ang. minimal infective dose), czyli minimalna liczba bakterii zdolna do wywołania choroby – jest bardzo mała, wynosząca dla *S. typhimurium* 10^2 komórek, metodę wykrywania tych bakterii powinna charakteryzować bardzo duża czułość. Dlatego właśnie w proponowanej w niniejszym opracowaniu metodzie zwrócono szczególną uwagę na proces przednamnażania i namnażania ogólnego wpływającego na poprawienie pewności oraz powtarzalności wyniku.

Prezentowaną metodę opracowano na podstawie wyników badań i danych piśmiennictwa. Została ona sprawdzona w badaniach z zastosowaniem szczepu referencyjnego *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) pod kątem oszacowania jej wykrywalności, czyli określenia najmniejszej wykrywanej liczby bakterii w badanej próbce. Przeprowadzone badania wykazały, że liczba ta może wynosić < 100 JTK (jednostek tworzących kolonie) *S. typhimurium* w 100 g mokrej masy próbki.

2. METODYKA BADAŃ

2.1. Zasada metody

Oznaczanie bakterii z rodzaju *Salmonella* w komunalnych osadach ściekowych polega na przeprowadzeniu wieloetapowej procedury, polegającej na hodowli w podłożach płynnych namnażających ogólnie oraz wybiórczo, a następnie po przesianiu na podłoże stałe namnażające wybiórczo lub różnicująco selektywne albo chromogenne identyfikacyjne, i stwierdzeniu obecności charakterystycznych, typowych JTK oraz potwierdzeniu wyniku za pomocą testu biochemicznego.

Opisana metoda może być stosowana do badania nie tylko komunalnych osadów ściekowych stabilizowanych w warunkach zarówno beztlenowych, jak i tlenowych, ale także nawozów organicznych i organiczno-mineralnych oraz organicznych i organiczno-mineralnych środków wspomagających uprawę roślin. Wszystkie wymienione rodzaje materiału badanego w opisie metody są określane mianem próbki.

2.2. Aparatura i sprzęt laboratoryjny

Do wykonania badania niezbędny jest następujący sprzęt laboratoryjny i aparatura:

- 1) sprzęt do pobierania próbek komunalnego osadu ściekowego dostosowany do struktury i konsystencji badanego materiału: laska Egnera, łopatką, czerpak,
- 2) aparatura służąca do ujednorodniania próbek: homogenizator obrotowy lub perystaltyczny, np. stomacher,
- 3) komplet sit glebowych o otworach od 2 do 3 mm,

- 4) waga techniczna,
- 5) wstrząsarka,
- 6) pH-metr o dokładności 0,1 jednostki pH z kompensacją temperatury,
- 7) lej Imhoffa lub wysoka, wąska zlewka,
- 8) 2 termostaty z nastawioną temperaturą 35° C i 41,5° C,
- 9) autoklaw lub pasteryzator (aparat Kocha),
- 10) komora laminarna (nie jest niezbędna),
- 11) sprzęt laboratoryjny stosowany w rutynowych badaniach bakteriologicznych.

2.3. Odczynniki i podłoża bakteriologiczne

Oprócz wymienionego sprzętu potrzebne są:

- 1) podłoże do namnażania ogólnego (bufor fosforanowy) – 34 g KH_2PO_4 oraz 1 mL Tween 80 należy rozpuścić w 1000 mL wody destylowanej; końcowa wartość pH buforu powinna wynosić 7,3,
- 2) fizjologiczny roztwór soli (0,85-procentowy roztwór wodny NaCl),
- 3) roztwór 96-procentowy etanolu lub Line-EtOH - eterówka,
- 4) płynne oraz stałe podłoża hodowlane dostępne w handlu, takie jak:
 - zbuforowana woda peptonowa (np. BWP-F) lub innego rodzaju rozcieńczalnik ogólnego zastosowania,
 - bulion Rappaport Vassiliadis Soja (RVS-T) lub inne równoważne płynne podłoże selektywnie namnażające, np. bulion wg Muller-Kauffmanna (MKTTnT),
 - agar XLD lub inne stałe podłoże selektywnie izolacyjne albo różnicujące lub identyfikacyjne przeznaczone do wykazania specyficznych właściwości mikroorganizmów, np. BGA, Hektoen, BPL SM ID, SM ID2, Mac Conkey,
- 5) test na oksydazę,
- 6) zestaw do barwienia metodą Grama,
- 7) zestaw do identyfikacji biochemicznej bakterii rodziny *Enterobacteriaceae*.

2.4. Wykonanie oznaczania

Dzień 1. Przygotowanie próbki średniej oraz próbki analitycznej. Po usunięciu kamieni, patyków i innych twardych elementów oraz dokładnym mechanicznym rozdrobieniu i ujednorodnieniu oraz wymieszaniu badanego materiału otrzymujemy laboratoryjną próbkę średnią. W celu uzyskania próbki do badania bakteriologicznego należy odważyć 100 g próbki średniej i sporządzić w leju Imhoffa lub w wysokiej wąskiej zlewce zawiesinę w buforze fosforanowym. Przygotowanie próbki średniej wymaga czasem przesiania za pomocą sit glebowych. Należy podkreślić, że na dokładność oznaczania ma wpływ wiele czynników, a głównie

– oprócz umiejętności i wiedzy osoby wykonującej badanie – sposób pobrania próbki pierwotnej lub zbiorczej oraz przygotowanie średniej próbki laboratoryjnej i analitycznej.

Niewłaściwe przygotowanie próbki do badań może prowadzić do uzyskania wyników zarówno fałszywie dodatnich, jak i fałszywie ujemnych. Próbki należy pobierać sprzętem wykonanym ze stali nierdzewnej lub z innego równorzędnego materiału odpornego na temperaturę stosowaną podczas sterylizacji. Sprzęt ten musi być czysty i wysterylizowany przed użyciem, sprzęt jednorazowego użytku natomiast powinien być jałowy.

Przygotowanie próbek średnich i analitycznych oraz prowadzenie badania powinno odbywać się z zachowaniem warunków jałowości.

Przednamnażanie ogólne. Zawiesinę osadu w leju Imhoffa sporządzoną z 100 g osadu w 1000 mL buforu fosforanowego poddaje się 24-godzinnej inkubacji w temperaturze pokojowej. Podczas tego etapu ze względu na stymulujące warunki wzrostu (obecność w buforze niejonowego detergentu Tween 80) następuje regeneracja komórek uszkodzonych oraz zwiększenie liczebności bakterii w wyniku ich uwolnienia (odklejenia komórek przez zneutralizowanie ładunku elektrostatycznego i osłabienie sił adhezyjnych lub usunięcie substancji hydrofobowych) od cząstek osadu ściekowego.

Dzień 2. Namnażanie ogólne. Etap ten obejmuje wykonanie posiewu 10 mL płynu pobranego z leja Imhoffa do 90 mL nieselektywnego podłoża BPW-F lub innego o podobnym składzie oraz 20-godziną inkubację w temperaturze 35–37°C.

Zadaniem nieselektywnego namnażania jest głównie regeneracja komórek bakterii *Salmonella* sp., potencjalnie uszkodzonych podczas procesów technologicznych, oraz osłabienie rozwoju bakterii towarzyszących, licznie obecnych w osadach ściekowych, a niepożądanych z punktu widzenia celu badań. Zwielokrotnienie liczby etapów namnażania może być również ważnym czynnikiem wzmocnienia fizjologicznego wykrywanych bakterii *Salmonella* sp. i uniknięcia ewentualnego toksycznego działania stałych podłoży różnicująco-selektywnych, stosowanych w dalszym postępowaniu, co mogłoby mieć miejsce, jeśli były zastosowane bez pośrednich etapów namnażania.

Dzień 3. Namnażanie selektywne. Etap namnażania selektywnego polega na zaszczerpieniu 10 mL podłoża RVS-T 0,1 mL hodowli z podłoża BPW-F i inkubacji 24-godzinnej oraz 48-godzinnej w temperaturze 41,5°C. Silnie selektywne podłoże oraz warunki inkubacji sprzyjają wzrostowi bakterii *Salmonella* sp., która rośnie w postaci mlecznego osadu bez zmiany niebieskiej barwy podłoża.

Dzień 4. Izolacja na podłożu stałym różnicująco-selektywnym. Posiane płytki agar XLD inkubuje się w termostacie w pozycji odwróconej, w celu uniknięcia rozmycia JTK przez wodę kondensacyjną, zbierającą się na wieczku płytki, przez 20 godzin w temperaturze 35–

37°C. Posiew powierzchniowy za pomocą ezy na stałe podłoże selektywnie różnicujące XLD, należy wykonać także po 48-godzinnej inkubacji podłoża płynnego RVS-T. Po okresie inkubacji na powierzchni pożywki pojawiają się drobnoustroje, w postaci pojedynczych kolonii, z których wiele będzie czystymi kulturami, ponieważ wywodzą się z jednej komórki. Podłoże pozwala określić zdolność do fermentacji cukrów, dekarboksylacji lizyny i wytwarzanie H₂S. Po inkubacji dokonuje się wstępnej identyfikacji na podstawie wyglądu JTK wyrosłych na podłożu. Na podłożu XLD jednostki tworzące kolonie (JTK) podejrzane o przynależność do rodzaju *Salmonella* mają następujące charakterystyczne cechy morfologiczne:

- 1) mogą być bezbarwne, bardzo jasne, lekko błyszczące i przezroczyste (kolor podłoża) z czarno zabarwionym środkiem, otoczone jasnoczerwoną strefą i z żółtym brzegiem,
- 2) mieć zabarwienie od różowego do czerwonego, z czarnym środkiem lub bez czarnego środka. JTK H₂S (-) są bezbarwne lub jasnoróżowe z ciemniejszymi środkami, a JTK laktoza (+) są żółte lub bez charakterystycznego zaczernienia.

W razie zastosowania innego różnicującego podłoża stałego cechy morfologiczne JTK podejrzanych o przynależność do rodzaju *Salmonella* będą też inne niż wyżej wymienione. Jako przykład podano podłoża najczęściej stosowane w rutynowych badaniach w bakteriologii lekarskiej, a szczególnie klinicznej.

Na podłożu BGA będą to JTK drobne, wypukłe, barwy czerwonoróżowej, na tle pożywki czerwoniśniowej, natomiast JTK *Salmonella* laktoza (+) są żółte z lub bez charakterystycznego zaczernienia; pozostałe JTK są barwy białej.

Na podłożu Wilson-Blaira JTK podejrzane o przynależność do rodzaju *Salmonella* są czarne z metalicznym połyskiem otoczone brunatnoczarną strefą z zaczernieniem pożywki pod JTK; przy gęstym wzroście JTK mogą być zielone.

Na podłożu Hektoen JTK *Salmonella* H₂S (+) są niebieskozielone z czarnym środkiem, a JTK H₂S (-) niebieskozielone bez czarnego centrum.

Na agarze BPL JTK *Salmonella* mają postać drobnych przezroczystych, różowych kolonii.

Na podłożu agarowym SM ID oraz SM ID 2 dzięki zawartości substratów chromogennych *Salmonella* sp., w tym laktoza (+) wytwarzająca esterazę, tworzy JTK o zabarwieniu blade różowym do fioletowo-różowego.

Dzień 5. Szybka identyfikacja potwierdzająca lub przygotowanie do takiej identyfikacji. Jeżeli na podłożu agarowym XLD, JTK charakteryzujące się podanymi cechami morfologicznymi JTK są luźno rozmieszczone i wyraźnie od siebie oddzielone, identyfikację po wykonaniu testu na oksydazę i barwienia metodą Grama można wykonać bezpośrednio z tego podłoża, przez posiew zawiesiny bakteryjnej sporządzonej z 3–5 JTK w jałowym 0,85-procentowym roztworze NaCl, na szereg testów biochemicznych. Ogólnie tylko oksydazo-ujemne i Gram-ujemne pałeczki powinny być badane za pomocą testów biochemicznych.

Zastosowanie do tego celu testu BioMerieux o nazwie handlowej API RapiD 20E, pozwoli nam uzyskać wynik po 4–6-godzinnej inkubacji, w temp. 35–37°C.

W razie uzyskania na podłożu XLD gęstego wzrostu JTK oraz jeżeli poszczególne JTK występują blisko siebie, w celu wyizolowania pojedynczych JTK należy wykonać posiew powierzchniowy za pomocą ezy na podłoże agarowe zawierające laktozę, np. Mac Conkey. Posiane płytki należy inkubować przez 20 godzin, w temperaturze 35–37°C.

Po zakończeniu inkubacji, wykonaniu testu na oksydazę i barwienia metodą Grama przystępujemy do przeprowadzenia identyfikacji biochemicznej.

Potwierdzenie przynależności do rodzaju *Salmonella* na podstawie właściwości metabolicznych przeprowadza się za pomocą testu biochemicznego, przygotowanego zgodnie z recepturą we własnym zakresie lub przy wykorzystaniu gotowych zestawów dostępnych w handlu zgodnie z przyjętymi lub opracowanymi przez producenta zasadami.

Większość dostępnych w handlu gotowych zestawów do identyfikacji pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae* umożliwia różnicowanie bakterii do poziomu rodzaju *Salmonella*.

Podanie wyniku. Wynik badania podaje się określając obecność lub brak bakterii *Salmonella* sp. w 100 g mokrej masy badanej próbki.

3. PODSUMOWANIE

Wykrywanie bakterii *Salmonella* sp. w próbkach osadów ściekowych nie należy do łatwych badań. Występujące w badaniach trudności związane są głównie z małą liczebnością bakterii oraz prawdopodobnie ze sporadycznym ich występowaniem. Proponowana procedura jakościowego wykrywania bakterii *Salmonella* sp. opracowana w toku badań prezentowanych w tym artykule, wprowadza do rutynowego postępowania kombinację dodatkowych etapów, polegających na nieselektywnym przednamnażaniu wstępnym i namnażaniu wstępnym o charakterze ogólnym oraz etap właściwego namnażania wybiórczego. Ponadto, etap polegający na inkubacji zawiesiny badanego osadu w buforze fosforanowym z dodatkiem detergentu niejonowego Tween 80 umożliwia lepsze oddzielenie komórek bakterii od cząstek osadu.

Wprowadzony do metody etap namnażania z zastosowaniem wody peptonowej jest bardzo ważny z punktu widzenia przywrócenia normalnej aktywności fizjologicznej bakterii poddanych różnym stresującym czynnikom występującym podczas procesów przeróbki i unieszkodliwiania osadów ściekowych. Etapy te zwiększają szansę oraz pewność wykrycia *Salmonella* sp., jeżeli nawet bakterie te występują w badanym osadzie w niewielkiej liczbie lub w stanie tzw VBNC. Z punktu widzenia wykrywalności bakterii *Salmonella* sp. modyfikacja metody polegająca na polepszeniu jej wykrywalności jest bardzo ważna ze względu na niską dawkę infekcyjną tych bakterii dla człowieka.

Pomimo wprowadzonych do prezentowanej procedury dodatkowych etapów, metoda ta jest zgodna z ogólną charakterystyką referencyjnej metody wykrywania obecności bakterii

Salmonella sp. w badanej próbce osadu, zgodnie z rozporządzeniem Ministra Środowiska z 2002 r. wymagającą „*przewodzenia hodowli na podłożach namnażających i różnicująco-selektywnych oraz potwierdzenia wyników badaniem biochemicznym*”.

PIŚMIENNICTWO

- HOLT J.G., KRIEG N.R., SNEATH P.H.A., STALEY J.T., WILLIAMS S.T. 2004. Bergeys Manual of Determinative Bacteriology. Wyd. 9 Lippincott Williams and Wilkins A Wolters Company.
- HU C.J., GIBBS R.A. 1995. A comparison of culture methods for the detection of *Salmonella* in wastewater sludge. *Wat.Sci. Tech.* 31:5-6.
- KALISZ L., NECHAY A., KAŹMIERCZUK M., SAŁBUT J., SZYPROWSKA E., GIERCZAK A., KOSTRZEWA-SZULC J. 2003. Fizyczno-chemiczne i biologiczne referencyjne metody badań komunalnych osadów ściekowych. Biblioteka Monitoringu środowiska. Inspekcja Ochrony Środowiska, Warszawa.
- KAŹMIERCZUK M., KALISZ L. 2006. Opracowanie podstaw do rozszerzenia kryteriów biologicznych o nowy wskaźnik bakteriologiczny kontroli sanitarnej osadów ściekowych pod kątem ich przyrodniczego wykorzystania (maszynopis). Instytut Ochrony Środowiska, Warszawa.
- KROGULSKA B., MATUSZEWSKA R. 2001. Metodyka wykrywania i izolacji *Salmonella* z wód powierzchniowych i ścieków. Wydawnictwa Metodyczne PZH, Warszawa.
- Mikrobiologia. Ogólne zasady metod wykrywania pałeczek *Salmonella*.** 1998. PN-ISO 6579.
- THOMPSON K.C., SHEPHERD R., HOCKIN A. 2004. Hygienic Parameters Feasibility of Horizontal Standards for *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. in Sludges, Soil, Soil Improvers, Growing Media and Biowastes. Alcontrol Laboratories.
- ZAREMBA M.L., BOROWSKI J. 2002. Mikrobiologia Lekarska. Podręcznik dla studentów medycyny. Wyd. III Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa.