

MIKROORGANIZMY LEKOOPORNE W GLEBACH NAWOŻONYCH OSADAMI ŚCIEKOWYMI

EWA STAŃCZYK-MAZANEK*, TERESA NALEWAJEK, MAGDALENA
ZABOCHNICKA

Wydział Inżynierii i Ochrony Środowiska
Instytut Inżynierii Środowiska
Politechnika Częstochowska
ul. Brzeźnicka 60 A, 42-200 Częstochowa, Polska
*Adres e-mail do korespondencji: ewastanczyk@wp.pl

Słowa kluczowe: Osady ściekowe, obornik, nawożenie, gleba, mikroorganizmy lekooporne, przeżywalność.

Streszczenie: Jedną z metod utylizacji, wykorzystującą własności nawozowe osadów, jest ich przyrodnicze, m.in. rolnicze użytkowanie (jeśli tylko spełniają dopuszczalne normy). Wraz z wprowadzanymi osadami do gleb mogą się też przemieszczać metale ciężkie, mikroorganizmy patogenne, powodując skażenie podłoża i pogorszenie się warunków rozwojowych dla organizmów autochtonicznych. Szczególne niebezpieczeństwo związane jest z występowaniem w osadach ściekowych drobnoustrojów lekoopornych. Problematyka ta nie jest jeszcze szczegółowo zbadana.

Celem badań auterek pracy było określenie zmian jakościowych drobnoustrojów lekoopornych w glebie piaszczystej nawożonej wybranymi osadami ściekowymi. Do zdegradowanej piaszczystej gleby wprowadzono osady po różnych procesach suszenia (naturalnie i solarnie). Badano wpływ metod suszenia osadów ściekowych na obecność mikroorganizmów lekoopornych w nawożonej nimi glebie.

Badania wykazały, że osady ściekowe suszone naturalnie na poletkach osadowych stanowią zagrożenie dla środowiska glebowego i ewentualnie dla ludzi i zwierząt mających kontakt z nawożonym gruntem. W użyźnianych osadami ściekowymi glebach piaszczystych pojawiały się formy patogeniczne wykazujące odporność na tzw. antybiotyki pierwszego uderzenia.

WPROWADZENIE

Oczyszczaniu ścieków zawsze towarzyszy wydzielenie osadów ściekowych. Jedną z metod utylizacji, wykorzystującą własności nawozowe osadów, jest ich przyrodnicze, m.in. rolnicze użytkowanie (jeśli tylko spełniają dopuszczalne normy) [9, 10, 16]. Wraz z wprowadzanymi osadami do gleb mogą się też przemieszczać metale ciężkie, mikroorganizmy patogenne, powodując skażenie podłoża i pogorszenie się warunków rozwojowych dla organizmów autochtonicznych [14, 15]. Szczególne niebezpieczeństwo związane jest z występowaniem w osadach ściekowych

drobnoustrojów lekoopornych [2, 11, 12]. Problematyka ta nie jest jeszcze szczegółowo zbadana. Celem badań autorek pracy było określenie zmian jakościowych drobnoustrojów lekoopornych w glebie piaszczystej nawożonej wybranymi osadami ściekowymi i obornikiem. Badania prowadzono w warunkach doświadczenia wazonowego. Zastosowano następujące dawki nawozów organicznych: 0, 10, 50, 100 i 200 (maksymalna dawka rekultywacyjna) ton na hektar. Do zdegradowanej piaszczystej gleby wprowadzono osady po różnych procesach suszenia (naturalnie na poletkach osadowych i solarnie w suszarni). Badano wpływ metod suszenia osadów ściekowych na obecność mikroorganizmów lekoopornych w nawożonej nimi glebie.

METODYKA BADAŃ

Do badań nawozowych wykorzystano glebę piaszczystą słabogliniastą. Odczyn gruntu wynosił 6,5. Glebę do badań pobrano z okolic Częstochowy. W celach porównawczych zastosowano dwa rodzaje osadów, które różniły się procesem przeróbki. Były to osady suszone naturalnie i solarnie. Wprowadzane do gleb osady według norm nadawały się do przyrodniczego, a nawet rolniczego wykorzystania. Doświadczenie prowadzono w warunkach laboratoryjnych, w kulturach wazonowych. Glebę nawożono wzrastającymi dawkami osadów ściekowych, które przeliczono na wazon doświadczalny tak, aby odpowiadały ilości 10, 50, 100 i 200 ton nawozu na hektar (10 dawka do rolniczego wykorzystania, 50–200 dawki rekultywacyjne wg obowiązującego podczas zakładania doświadczenia rozporządzenia [13]). Doświadczenie prowadzono w okresie jednego sezonu wegetacyjnego. Na użyźnionych podłożach uprawiano gorczycę białą (*Sinapis alba*). Wilgotność w każdym wazonie utrzymywano podczas trwania doświadczenia na poziomie 60%. Po okresie wegetacji trwającym 6 miesięcy pobrano próbki gleby do badań mikrobiologicznych. Próbki badane pobierane były z każdego wazonu do jałowych pojemników. Przy poborze prób zachowano procedury identyczne jak przy poborze materiału zakaźnego do badań. W warunkach laboratoryjnych pobierano z pojemników próbki gleby o wadze 10 g i umieszczano w jałowych płytkach Petriego. Aby zachować odpowiednią wilgotność zalewano każdą próbkę 2,5 ml jałowej wody destylowanej. Tak przygotowany materiał, posiewano eżą bakteriologiczną na podłoże krwawe i podłoże Mac Conkeya. Po 18-godzinnej inkubacji w 37°C dokonywano oceny wzrostu oraz izolacji poszczególnych wyhodowanych szczepów. Izolaty umieszczono na kolejne 18 godzin w 37°C, po czym wykonano testy biochemiczne celem identyfikacji poszczególnych gatunków. Równolegle zostały wykonane testy lekooporności według krajowych zaleceń [3]. Do testów lekooporności przygotowano podłoża Mueller–Hinton, używane w laboratoriach bakteriologicznych do oznaczania antybiotykooporności. Następnie nałożono krążki z odpowiednimi antybiotykami:

- ampicylina 10 µg,
- gentamycyna 10 µg,
- amikacyna 10 µg,
- ceftazydym 30 µg,
- amoksycyлина z kwasem klawulanowym 20/10 µg,
- cefotaksym 30 µg.

Po 15-minutowej preinkubacji płytki umieszczono w cieplarni o temp. 37°C na 18 godzin. Po tym czasie nastąpił odczyt wyników. Badania wszystkich materiałów zostały wykonane w trzech powtórzeniach. Wyniki stanowią średnią z tych powtórzeń.

WYNIKI BADAŃ I Dyskusja

W materiale będącym kontrolą (gleba piaszczysta nienawożona) wyhodowano laseczki tlenowe niechorobotwórcze. W glebach nawożonych osadami ściekowymi stwierdzono obecność warunkowych patogenów. Wyniki oznaczeń lekooporności drobnoustrojów w badanych podłożach zestawiono w tabelach 1 i 2.

Tabela 1. Wyniki odczytu lekooporności wyhodowanych szczepów patogenicznych z próbek gleby piaszczystej nawożonej osadami ściekowymi suszonymi naturalnie

Rodzaj wyizolowanego drobnoustroju	Dawka osadów ściekowych [t/h]	Wrażliwość drobnoustroju na rodzaj zastosowanego antybiotyku					
		Amikacyna	Amoksycylina z kwasem klawulanowym	Ceftazydym	Cefotaxym	Gentamycyna	Ampicylina
<i>Alcaligenes faecalis</i>	10	w	w	w	w	w	w
<i>Achromobacter denitrificans</i>	10	w	w	w	w	w	o
<i>Enterobacter</i> sp.	10	św	o	w	w	w	o
<i>Photobacterium luminescens</i>	10	w	w	w	w	w	o
<i>Alcaligenes faecalis</i>	50	w	o	w	o	w	o
<i>Achromobacter denitrificans.</i>	50	w	w	w	w	w	o
<i>Enterobacter</i> sp.	50	św	o	w	w	w	o
<i>Alcaligenes faecalis</i>	100	w	o	w	o	w	o
<i>Klebsiella oxytoca</i>	100	o	o	w	o	w	o
<i>Escherichia coli</i>	200	w	o	w	w	w	o
<i>Moraxella caprae</i>	200	w	w	w	w	w	o
<i>Klebsiella oxytoca</i>	200	w	o	w	o	w	o
<i>Enterobacter kobei</i>	200	o	w	w	w	w	o
<i>Citrobacter freundii</i>	200	św	o	o	o	w	o

w – wrażliwy ; św – średnio wrażliwy ; o – oporny

Tabela 2. Wyniki odczytu lekooporności wyhodowanych szczepów patogenicznych z próbek gleby piaszczystej nawożonej osadami ściekowymi suszonymi solarnie

Rodzaj wyizolowanego drobnoustroju	Dawka osadów ściekowych [t/h]	Wrażliwość drobnoustroju na rodzaj zastosowanego antybiotyku					
		Amikacyna	Amoksycylina z kwasem klawulanowym	Ceftazydym	Cefotaxym	Gentamycyna	Ampicylina
<i>Alcaligenes faecalis</i>	10	w	w	w	w	w	w
<i>Achromobacter piechandii</i>	10	w	w	w	w	w	w
<i>Alcaligenes faecalis</i>	50	w	w	w	w	w	w
<i>Alcaligenes faecalis</i>	50	w	w	w	w	w	w
<i>Alcaligenes faecalis</i>	100	w	w	w	w	w	w
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	200	w	w	w	w	w	o

w – wrażliwy ; *św* – średnio wrażliwy ; o – oporny

Osady miejskie zawierają drobnoustroje chorobotwórcze pochodzące od osób chorych oraz nosicieli. Wiadomo również, że procesy oczyszczania ścieków nie eliminują ich całkowicie. Najczęściej spotykanymi bakteriami w ściekach i osadach ściekowych są *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Clostridium botulinum*, *Vibrio cholerae*, *Mycobacterium tuberculosis* [1, 5]. Obornik z kolei jest rezerwuarem bakterii typu fekalnego, tj. *Escherichia coli*, *Streptococcus faecalis* oraz pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae* [17]. Szczególnie niebezpieczne są szczepy charakteryzujące się lekoopornością na powszechnie stosowane antybiotyki, ponieważ mogą stanowić poważne zagrożenie dla ludzi i zwierząt. Nadużywanie i nieracjonalne stosowanie antybiotyków grozi pojawieniem się w bakteriach mutacji, które prowadzą do rozwoju ich oporności na antybiotyki. To między innymi dlatego polscy lekarze coraz częściej znajdują się w sytuacji, w której nie mają czym leczyć pacjentów z ciężkimi zakażeniami. W badaniach oznaczono oporność form patogenicznych pojawiających się w glebie po wprowadzeniu wybranych osadów ściekowych na najczęściej stosowane w terapii antybiotyki. Najmniej skuteczne w stosunku do tych drobnoustrojów okazały się: ampicylina, amikacyna oraz amoksycylina z kwasem klawulanowym. Doniesienia literaturowe potwierdzają uzyskane przez autorów referatu wyniki. Pałeczki z rodziny *Enterobacteriaceae*, których przedstawicielem jest *Escherichia coli*, które izolowano ze ścieków oraz z osadów ściekowych, wykazywały oporność w stosunku do ampicyliny i penicyliny w badaniach Junko-Tejedor [4]. W badaniach Yang izolowano szczepy ze ścieków szpitalnych. Stwierdzono występowanie szczepów Gram-ujemnych, które charakteryzowały się opornością 85,6–94,1% w stosunku do ampicyliny [19]. Również w innych badaniach stwierdzono dość często występującą oporność bakterii *Escherichia coli* w stosunku do ampicyliny oraz amoksycyliny z kwasem klawulanowym. Lekooporność szczepów *Escherichia coli* w badaniach Nalewajek [8] pochodzących ze ścieków surowych w stosunku do amoksycyliny z kwasem klawulanowym wynosiła prawie 14%, a w oczyszczonych blisko 6%. Natomiast w stosunku do ampicyliny była to

wartość 50%, a w ściekach oczyszczonych 30% [8]. Efektywność oczyszczania ścieków pod kątem eliminacji bakterii chorobotwórczych według danych literaturowych zawiera się w przedziale między 25–99 % [18]. Analizując uzyskane wyniki badań stwierdzono, że suszenie solarne osadów ściekowych wpłynęło istotnie na zmniejszenie się ilości drobnoustrojów warunkowo patogennych, w tym lekoopornych. W glebach nawożonych osadami ściekowymi suszonymi solarne zidentyfikowano tylko jeden rodzaj bakterii *Pseudomonas alcaligenes* wykazujący się opornością w stosunku do ampicyliny. Na pozostałe rodzaje antybiotyków bakteria była wrażliwa. W glebach użyźnianych osadami ściekowymi suszonymi naturalnie na poletkach oznaczono 7 warunkowych patogenów wykazujących się opornością na zastosowane antybiotyki:

Achromobacter denitryficans – Gram-ujemne bakterie tlenowe, występują w glebie, u ludzi mogą prowadzić do zapalenia opon mózgowych, zapalenia płuc, zapalenia wsierdza, zapalenia otrzewnej, zapalenia kości, zakażenia dróg moczowych.

Enterobacter species – Gram-ujemne bakterie z tego rodzaju mają pochodzenie fekalne, mogą powodować m.in. zapalenie wsierdza, zakażenia dolnych dróg oddechowych.

Photobacterium luminescens – bakteria Gram-ujemna, należy do rodziny *Enterobacteriaceae*, żyje w glebie, często w symbiozie z nicieniami, może sama produkować związki o charakterze układu moczowego, pokarmowego i dróg żółciowych, stany zapalne zatok, ucha środkowego, zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, stany zapalne tkanek miękkich oraz zapalenie szpiku. Patogeniczna głównie dla owadów, sporadycznie ludzi.

Klebsiella oxytoca – należy do rodziny pałeczek jelitowych (*Enterobacteriaceae*), może powodować: posocznicę, wstrząs endotoksyczny, zapalenie płuc, ropnie płuc, zakażenia skóry.

Moraxella caprae – Gram-ujemna bakteria, ma własności hemolityczne, powoduje zakażenia dróg oddechowych u zwierząt, sporadycznie u ludzi.

Enterobacter kobei – bakteria Gram-ujemna, z rodzaju *Enterobacteriaceae*, może być m.in. przyczyną zakażeń szpitalnych, może powodować infekcje układu moczowego.

Citrobacter freundii – bakteria Gram-ujemna, z rodzaju *Enterobacteriaceae*, może powodować infekcje układu moczowego i tzw. ogólne zakażenia, również układu pokarmowego i oddechowego [18].

WNIOSKI

Nadużywanie i nieracjonalne stosowanie antybiotyków grozi pojawieniem się w bakteriach mutacji, które prowadzą do rozwoju ich oporności na antybiotyki [7, 6]. Szczególnie duże niebezpieczeństwo związane z pojawieniem się takich form mikroorganizmów występuje w osadach ściekowych. Do ścieków i produktów ich oczyszczania – osadów ściekowych, trafiają zanieczyszczenia biologiczne z przemysłu, szpitali i gospodarstw domowych.

Badania wykazały, że osady ściekowe suszone naturalnie na poletkach osadowych stanowią zagrożenie dla środowiska glebowego i ewentualnie dla ludzi i zwierząt mających kontakt z nawożonym gruntem. W użyźnianych tymi osadami ściekowymi glebach piaszczystych pojawiały się formy patogeniczne wykazujące odporność na tzw. antybiotyki pierwszego uderzenia [3, 8]. Suszenie solarne spowodowało istotny spadek ilości form lekoopornych w osadach ściekowych.

Źródło finansowania

Środki na badania Instytutu Inżynierii Środowiska Politechniki Częstochowskiej - BS 401/301/08

LITERATURA

- [1] Ceprowski M., J. Szarapińska-Kwaszewska, B. Dudkiewicz, J.A. Krajewski, I. Szadkowska-Stańczyk: *Ocena narażenia pracowników oczyszczalni ścieków na czynniki szkodliwe występujące w miejscu pracy*, *Medycyna Pracy*, **56(3)**, 213–222, (2005).
- [2] Holzel Ch. S., K. Schwaiger, K. Harms, H. Kuchenhoff, A. Kunz, K. Meyer, Ch. Muller, J. Bauer: *Sewage Sludge and Liquid Pig Manure as Possible Sources of Antibiotic Resistant Bacteria*, *Environmental Research*, **110**, 318–326, (2010).
- [3] Hryniewicz W., A. Sulikowska: *Rekomendacje doboru testów do oznaczania wrażliwości bakterii na antybiotyki i chemioterapeutyki*, Rekomendacje Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego, Warszawa 2006.
- [4] Junko-Tejedor T.: *Identification and antibiotic resistance of faecal enterococci isolated from water samples*, *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, **203**, 363–368, (2001).
- [5] Marcinkowski T.: *Alkaliczna stabilizacja komunalnych osadów ściekowych*, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, **76**, (ser. 43), 6–7, 11, 23, (2004).
- [6] Markiewicz Z., Z. Kwiatkowski: *Bakterie antybiotyki, lekooporność*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2006.
- [7] Mazur E., S. Klag: *Mechanizmy lekooporności bakterii*, *Medycyna Rodzinna*, **6**, (2004).
- [8] Nalewajek T.: *Ocena lekooporności szczepów Escherichia coli oraz wpływ promieniowania laserowego i UV na rozwój bakterii w ściekach*. Praca inżynierska, Bytom 2008.
- [9] Ociepa E., A. Kisiel, J. Lach: *Effect of fertilization with sewage sludges and composts on the change of cadmium and zinc solubility in soils*, *Polish J. Environ. Stud. Series of Monographs*. Ed. by January Bień and Lidia Wolny, **2**, 171–176, (2010).
- [10] Ociepa A., K. Pruszek, J. Lach, E. Ociepa: *Wpływ długotrwałego nawożenia gleb obornikiem i osadem ściekowym na wzrost zawartości metali ciężkich w glebach*, *Ecological Chemistry and Engineering S*, vol. **15(1)**, 103–109, (2008).
- [11] Reinthaler F.F., G. Feierl, H. Galler, D. Haas, E. Leitner, F. Mascher, A. Melkes, J. Posch, I. Winter, G. Zarfel, E. Marth: *ESBL-producing E. coli in Austrian sewage sludge*, *Water Research*, **44**, 1981–1985, (2010).
- [12] Reinthaler F.F., J. Posch, G. Feierl, G. Wust, D. Haas, G. Ruckenbauer, F. Mascher, E. Marth: *Antibiotic resistance of E. coli in sewage and sludge*, *Water Research*, **37**, 1685–1690, (2003).
- [13] Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 1 sierpnia 2002 r. w sprawie komunalnych osadów ściekowych.
- [14] Stańczyk-Mazanek E., J. Sobik-Szołtysek: *Investigation of the accumulation of heavy metals in soils and flotation discards fertilized with selected sewage sludge*, *Polish Journal of Environmental Studies*, **2**, 221–224, (2010).
- [15] Stańczyk-Mazanek E., L. Stępnia, J. Bień: *Investigation of the soil fertility index based on the analysis of the biological composition of grounds treated with selected sewage sludge*, *Polish Journal of Environmental Studies*, **2**, 216–220, (2010).
- [16] Szala B., Z. Paluszak: *Inactivation of Escherichia coli during composting process of organic wastes with sewage sludge*, *Archives of Environmental Protection*, **36(2)**, 57–63, (2010).
- [17] Szostak B., S. Jeziorska-Tys: *Intensywność procesu amonifikacji i nitryfikacji w glebie na terenie fermy świń*, *Acta Agrophysica*, **6(1)**, 251–260, (2005).
- [18] Virella G.: *Mikrobiologia i choroby zakaźne*, WMUiP, 2000.
- [19] Yang C. M.: *Comparison of antimicrobial resistance patterns between clinical and sewage isolates in a regional hospital in Taiwan*. *Journal Compilation, The Society for Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiology*, **48**, 560–565, (2009).