



## **Przeżywalność pałeczek *Salmonella* Enteritidis w gnojowicy świńskiej**

*Bożena Szejniuk, Katarzyna Budzińska, Grzegorz Wroński,  
Małgorzata Magdalena Kostrzewa, Anita Jurek  
Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy, Bydgoszcz*

### **1. Wstęp**

Nawozowe wykorzystanie gnojowicy, ze względu na znaczną zawartość substancji biogenych, jest niewątpliwie ważnym czynnikiem plonotwórczym, a także przyczynia się do rozwoju cennej mikroflory glebowej. W rolniczym stosowaniu gnojowicy, obok jej dużej wartości nawozowej, bardzo istotne są również aspekty sanitarno-higieniczne [11, 17]. Gnojowica zawierać może zarówno mikroorganizmy saprofityczne, jak i liczne chorobotwórcze bakterie, wirusy, grzyby oraz jaja i oocysty pasożytów. Należy podkreślić, że gnojowica nie podlega procesowi samozagrzania, dlatego przy braku lub niewłaściwych metodach jej higienizacji może być źródłem rozprzestrzeniania się w środowisku drobnoustrojów patogennych [1, 6], w tym również pałeczek *Salmonella* Enteritidis. Jak donosi Puchalski i wsp. [16], infekcje powodowane przez te bakterie od wielu lat stanowią w Polsce istotny problem. Pałeczki z rodzaju *Salmonella* mogą przeżywać w gnojowicy przez długi czas [15, 18] i w następstwie nawozowego jej wykorzystania prowadzić do skażenia gleb,

roślin uprawnych oraz wód, co stwarza poważne niebezpieczeństwo dla zdrowia ludzi i zwierząt [1, 2].

Celem pracy było określenie w badaniach modelowych przeżywalności i tempa eliminacji bakterii *Salmonella* Enteritidis w gnojowicy pochodzącej z fermy trzody chlewnej oraz oszacowanie ryzyka sanitarno-epidemiologicznego, wynikającego z możliwości rozprzestrzeniania się testowanych mikroorganizmów w środowisku naturalnym.

## 2. Materiał i metody

Do badań laboratoryjnych wykorzystano świeżą gnojowicę świńską, w której oznaczano czas przeżycia oraz tempo inaktywacji pałeczek *Salmonella* Enteritidis zgodnie z normą PN-EN ISO 6579:2003. Zaszczepione testowanymi bakteriami próby gnojowicy przechowywano w dwóch wariantach temperaturowych: 4 i 20°C przez okres 10 tygodni. Określenie liczebności mikroorganizmów *Salmonella* Enteritidis w materiale doświadczalnym prowadzono w oparciu o metodę najbardziej prawdopodobnej liczby drobnoustrojów (NPL) w układzie trzech próbek.

### 2.1. Przygotowanie prób do badań

Zawiesinę bakteryjną przygotowano wprowadzając do 20 ml soli fizjologicznej z peptonem kolonie *Salmonella* Enteritidis wyhodowane na Tryptic Soy Agar. Przy użyciu densytometru Vitek Systems ATB 1550, uzyskano według skali Mc Farlanda zawiesinę oznaczanych drobnoustrojów o gęstości  $8,0 \cdot 10^8$  NPL/cm<sup>3</sup>. Sporządzoną zawiesinę bakteryjną dodano do badanej objętości gnojowicy i dokładnie wymieszano. Do badań wykorzystano 6 dm<sup>3</sup> materiału doświadczalnego, z czego 1 dm<sup>3</sup> przeznaczono do wstępnych badań fizykochemicznych. Pozostałe 5 dm<sup>3</sup> gnojowicy rozlano do dwóch bioreaktorów po 2,5 dm<sup>3</sup> każdy i umieszczono w specjalnych komorach o temperaturze 4 i 20°C.

### 2.2. Badania mikrobiologiczne

Ilościowe oznaczenie pałeczek *Salmonella* Enteritidis w materiale doświadczalnym przeprowadzono określając najbardziej prawdopodobną liczbę drobnoustrojów (NPL), korzystając z tablic Mc Crady'ego.

W celu określenia liczebności badanych bakterii w początkowym etapie eksperymentu stosowano płynne podłoża namnażające – 1% wodę peptonową oraz podłoże wybiórcze według Rappaporta i Vassiliadisa.

W dalszej kolejności hodowle przenoszono na pożywki stałe – agar XLD z ksylozą, lizyną i dezoksychohanem sodu oraz agar BPL, z zielenią brylantową, czerwienią fenolową i laktozą. Podłoża stałe inkubowano w temperaturze 37°C przez 24 godziny. Końcową fazę identyfikacji drobnoustrojów przeprowadzono za pomocą surowicy poliwalentnej HM.

### **2.3. Badania fizykochemiczne**

Gnojowicę świńską przeznaczoną do badań poddano podstawowej ocenie fizykochemicznej (tab. 1). Zakres wykonanych analiz obejmował oznaczenie: odczynu, zawartości suchej masy, ChZT<sub>Cr</sub>, BZT<sub>5</sub>, azotu ogółem, azotu amonowego, fosforu ogółem, chlorków, siarczanów oraz metali ciężkich za pomocą metod stosowanych w chemii rolnej [14].

### **2.4. Analiza statystyczna**

Uzyskane wyniki badań przeżywalności *Salmonella* Enteritidis w gnojowicy świńskiej zweryfikowano, a następnie poddano transformacji logarytmicznej oraz analizie statystycznej w oparciu o zmiany liczby bakterii w czasie według wzoru:

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

gdzie:

$N$  – liczba bakterii w danym czasie w gnojowicy,

$a$  – 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 determinacji i regresji, a także ustalono teoretyczny czas przeżycia oraz tempo inaktywacji *Salmonella* Enteritidis w gnojowicy na podstawie przebiegu prostych regresji.

### 3. Wyniki badań i ich omówienie

#### 3.1. Wyniki analizy fizykochemicznej gnojowicy

Wyniki przeprowadzonej analizy fizykochemicznej gnojowicy przedstawiono w tabeli 1. Zawartość cennych składników nawozowych według wielu autorów w dużej mierze uzależniona jest od zawartości suchej masy. W badanej gnojowicy świńskiej zawartość suchej masy ogółem była niska i wyniosła 3,80%. Kluczek [5] na podstawie badań własnych ustalił zawartość suchej masy gnojowicy pochodzącej od trzody chlewnej i bydła odpowiednio na poziomie 8,39% i 6,97%. Analiza fizykochemiczna gnojowicy w doświadczeniu Olszewskiej i wsp. [13] wykazała zawartość suchej masy równą 6,02%.

**Tabela 1.** Właściwości fizykochemiczne gnojowicy świńskiej  
**Table 1.** Physicochemical properties of pig slurry

Parametr	Jednostka	Wartość
odczyn	pH	8,11
sucha masa ogółem	%	3,80
sucha masa organiczna	%	3,17
ChZT <sub>Cr</sub>	mg O <sub>2</sub> /dm <sup>3</sup>	47820,00
BZT <sub>5</sub>	mg O <sub>2</sub> /dm <sup>3</sup>	20250,00
azot ogółem	mg N/dm <sup>3</sup>	1363,07
azot amonowy	mg NH <sub>4</sub> /dm <sup>3</sup>	1204,05
fosfor ogółem	mg P/dm <sup>3</sup>	255,10
chlorki	mg Cl/dm <sup>3</sup>	916,87
siarczany	mg SO <sub>4</sub> /dm <sup>3</sup>	460,01
cynk	mg Zn/dm <sup>3</sup>	13,13
glin	mg Al/dm <sup>3</sup>	0,66
mangan	mg Mn/dm <sup>3</sup>	0,48
żelazo	mg Fe/dm <sup>3</sup>	15,40

Badana gnojowica zawierała średnio 255,10 mg/dm<sup>3</sup> fosforu ogółem, natomiast koncentracja azotu ogółem wyniosła 1363,07 mg/dm<sup>3</sup>. Zawartości powyższych pierwiastków w gnojowicy bydłowej badanej przez Olszewską [10] wynosiły odpowiednio 2171 i 6232 mg/dm<sup>3</sup>. Spo-

śród metali ciężkich obecnych w analizowanej gnojowicy, stwierdzono zdecydowanie mniejszą ilość cynku w odniesieniu do rezultatów uzyskanych przez Budzińską [3], która oznaczyła jej zawartość na poziomie 44,70 mg/dm<sup>3</sup>. Badania własne wykazały, że gnojowica była również uboższa w chlorki (916,87 mg O<sub>2</sub>/dm<sup>3</sup>) w porównaniu do badań Krapaca i wsp. [7], gdzie stwierdzono ich udział w granicach 990,00 mg/dm<sup>3</sup>.

Parametr ChZT<sub>Cr</sub> w doświadczeniu własnym kształtował się na poziomie 47820 mg O<sub>2</sub>/dm<sup>3</sup>, natomiast wartość BZT<sub>5</sub> wynosiła 20250 mg O<sub>2</sub>/dm<sup>3</sup>. W badaniach Kutery [8] wartości obu parametrów zostały ustalone w granicach: 25000 mg O<sub>2</sub>/dm<sup>3</sup> (ChZT<sub>Cr</sub>) i 13800 mg O<sub>2</sub>/dm<sup>3</sup> (BZT<sub>5</sub>).

### 3.2. Wyniki badań mikrobiologicznych

Drobnoustroje z rodzaju *Salmonella* nie znajdują naturalnego środowiska w glebie i nawozach naturalnych umożliwiającego im stałe bytowanie. Bakterie te mogą przez krótki czas namnażać się, jednak w końcowym efekcie podlegają procesowi częściowej lub całkowitej eliminacji. Wyniki badań zmian liczebności pałeczek *Salmonella Enteritidis* w gnojowicy świńskiej przedstawiono w tabeli 2.

Liczba badanych drobnoustrojów w pierwszym tygodniu oznaczenia wynosiła  $1,9 \cdot 10^8$  NPL/cm<sup>3</sup> w temperaturze 4°C, natomiast w temperaturze 20°C osiągnęła wartość  $4,5 \cdot 10^7$  NPL/cm<sup>3</sup>, po czym w drugim oznaczeniu w obu wariantach temperaturowych obniżyła się do poziomu  $2,5 \cdot 10^7$  NPL/cm<sup>3</sup>. W trzecim oznaczeniu liczba pałeczek *Salmonella Enteritidis* w temperaturze 20°C przyjęła wartość  $9,5 \cdot 10^4$  NPL/cm<sup>3</sup>, zaś podczas kolejnych oznaczeń w tej temperaturze badane bakterie nie zostały stwierdzone. Z kolei w temperaturze 4°C liczebność mikroorganizmów w trzecim oznaczeniu wzrosła do wartości  $9,5 \cdot 10^7$  NPL/cm<sup>3</sup>, po czym w następnych okresach badawczych systematycznie zaczęła obniżać się. W 8. tygodniu eksperymentu nie wykryto już testowanych drobnoustrojów (tab. 2).

Uzyskane w badaniach własnych wyniki wskazują na wyraźny wpływ temperatury na tempo eliminacji pałeczek *Salmonella Enteritidis* w gnojowicy świńskiej (tab. 3, rys. 1 i 2). W analizowanych próbach stwierdzono tendencję do spowolnienia dynamiki inaktywacji testowanych mikroorganizmów wraz z obniżeniem temperatury składowania gnojowicy. Dienne tempo redukcji liczby bakterii *Salmonella Enteritidis* w gnojowicy według obliczeń statystycznych w temperaturze 4°C wyno-

siło 0,94 log, natomiast w temperaturze 20°C było znacznie większe i przyjęło wartość 2,54 log. Ustalony na podstawie analizy regresji teoretyczny czas przeżycia oznaczanych bakterii w gnojowicy przechowywanej w temperaturze 4°C wynosił 10,7 tygodnia, podczas gdy w temperaturze 20°C był znacznie krótszy i nie przekraczał 4,5 tygodnia (tab. 3).

**Tabela 2.** Liczba bakterii *Salmonella* Enteritidis w próbach gnojowicy świńskiej w czasie doświadczenia

**Table 2.** Number of bacteria *Salmonella* Enteritidis in the samples of pig slurry during the experiment

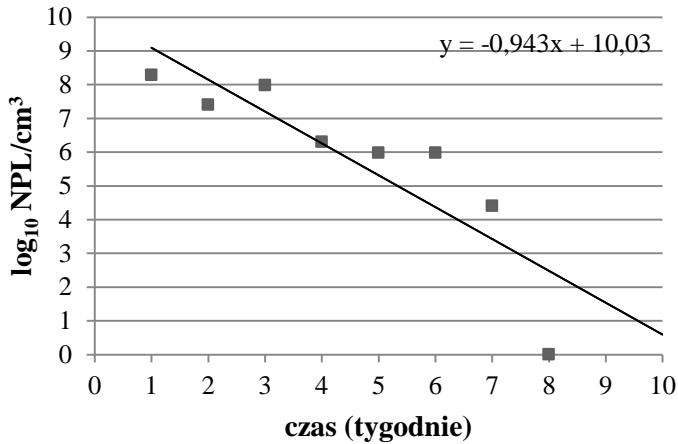
Tygodnie badań	Liczba pałeczek <i>Salmonella</i> Enteritidis [NPL/cm <sup>3</sup> ] w temperaturze 4°C	Liczba pałeczek <i>Salmonella</i> Enteritidis [NPL/cm <sup>3</sup> ] w temperaturze 20°C
1.	$1,9 \cdot 10^8$	$4,5 \cdot 10^7$
2.	$2,5 \cdot 10^7$	$2,5 \cdot 10^7$
3.	$9,5 \cdot 10^7$	$9,5 \cdot 10^4$
4.	$20,0 \cdot 10^5$	n.s.
5.	$9,5 \cdot 10^5$	n.s.
6.	$9,5 \cdot 10^5$	n.s.
7.	$2,5 \cdot 10^4$	n.s.
8.	n.s.	n.s.
9.	n.s.	n.s.
10.	n.s.	n.s.

n.s. – nie stwierdzono

**Tabela 3.** Współczynniki regresji charakteryzujące dynamikę inaktywacji pałeczek *Salmonella* Enteritidis w badanych próbach gnojowicy

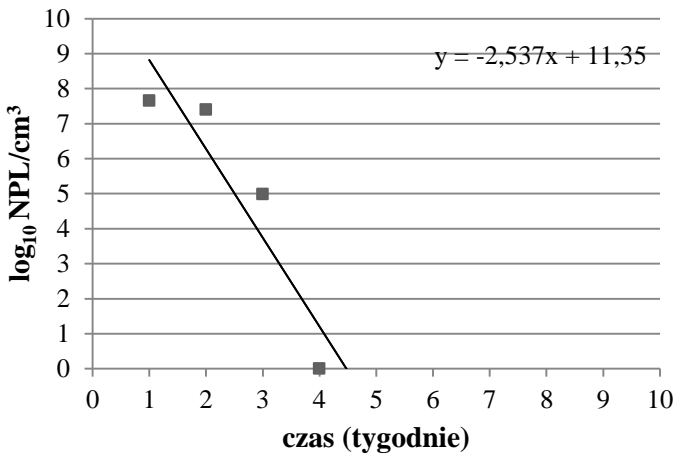
**Table 3.** Regression coefficients characterizing the inactivation dynamics of *Salmonella* Enteritidis in the tested samples of slurry

Badana próba	Równanie prostej regresji	Wartość $r^2$	Maksymalny czas przeżycia (tygodnie)
4°C	$y = -0,94x + 10,03$	0,76	10,7
20°C	$y = -2,54x + 11,35$	0,85	4,5



**Rys. 1.** Prosta regresji charakteryzująca tempo eliminacji bakterii *Salmonella* Enteritidis w gnojowicy w temperaturze 4°C

**Fig. 1.** Regression line characterizing the elimination rate of bacteria *Salmonella* Enteritidis in slurry at 4°C



**Rys. 2.** Prosta regresji charakteryzująca tempo eliminacji bakterii *Salmonella* Enteritidis w gnojowicy w temperaturze 20°C

**Fig. 2.** Regression line characterizing the elimination rate of bacteria *Salmonella* Enteritidis in slurry at 20°C

Zaobserwowane w badaniach własnych zjawisko wydłużania się przeżywalności testowanych drobnoustrojów w gnojowicy przy niskich temperaturach jest zbieżne z wynikami uzyskanymi przez Arrusa [1] oraz Plachá i wsp. [15]. W doświadczeniu przeprowadzonym przez Olszewską i wsp. [12] maksymalny czas przeżycia pałeczek *Salmonella* Enteritidis wyniósł w próbie gnojowicy przechowywanej w temperaturze 4°C 10 tygodni, natomiast w temperaturze 20°C oznaczane drobnoustroje izolowano tylko do 6. tygodnia badań. Z kolei w eksperymencie nad tempem eliminacji bakterii *Salmonella* Dublin z gnojowicy bydłowej wykazano, że przeżywalność tych drobnoustrojów wynosiła 21 tygodni w temperaturze 4°C i 16 tygodni w temperaturze 20°C [10]. Według Maćkowiaka [9] pałeczki *Salmonella* Enteritidis są w stanie przeżyć w gnojowicy w temperaturze 8°C do 325 dni, podczas gdy w temperaturze 17°C ich czas przeżycia jest krótszy i wynosi 180 dni. Należy również podkreślić, że na stopień przeżywalności pałeczek *Salmonella* Enteritidis w gnojowicy, obok warunków temperaturowych wpływ także wywiera obecność autochtonicznych mikroorganizmów oraz zawartość substancji pokarmowych [1, 4]. Jak podaje Budzińska [3], krótszy czas przeżycia badanych bakterii w gnojowicy w temperaturze 20°C, związany jest z faktem silniejszego rozwoju naturalnej mikroflory, która wykazuje antagonistyczne oddziaływanie wobec patogennych drobnoustrojów, w tym pałeczek z rodzaju *Salmonella*.

#### 4. Wnioski

1. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że pałeczki *Salmonella* Enteritidis podlegały stopniowej eliminacji w gnojowicy pochodzącej od trzody chlewnej, przy czym dynamika inaktywacji drobnoustrojów była zależna od warunków termicznych procesu jej składowania.
2. Wykazano dłuższą przeżywalność oznaczanych bakterii w gnojowicy świńskiej w temperaturze 4°C w porównaniu z temperaturą 20°C.
3. Ustalony na podstawie analizy regresji teoretyczny czas przeżycia badanych drobnoustrojów w gnojowicy wyniósł 10,7 tygodnia w temperaturze 4°C i 4,5 tygodnia w temperaturze 20°C.
4. Z rezultatów doświadczenia wynika, że możliwość przeżycia pałeczek *Salmonella* Enteritidis w badanej gnojowicy stanowi ryzyko rozprzestrzeniania się tych drobnoustrojów w środowisku naturalnym, jak również stwarza potencjalne zagrożenie dla zdrowia ludzi i zwierząt.



## Literatura

1. **Arrus K. M., Holley R. A., Ominski K. H., Tenuta M., Blank G.:** *Influence of temperature on Salmonella survival in hog manure slurry and seasonal temperature profiles in farm manure storage reservoirs.* Livest. Sci., 102, 226÷236. 2006.
2. **Baloda S. B., Christensen L., Trajcevska S.:** *Persistence of a Salmonella enterica serovar Typhimurium DT12 clone in a piggery and in agricultural soil amended with Salmonella-contaminated slurry.* Appl. Environ. Microbiol., 67, 2859÷2862. 2001.
3. **Budzińska K.:** *Survivability of Salmonella Senftenberg W<sub>775</sub> in cattle slurry under various temperature conditions.* Folia biol., 53, 145÷150. 2005.
4. **Himathongkham S., Bahari S., Riemann H., Cliver D.:** *Survival of Escherichia coli O157:H7 and Salmonella typhimurium in cow manure and cow manure slurry.* FEMS Microbiol. Lett., 178, 251÷257. 1999.
5. **Kluczek J. P.:** *Aspekty sanitarno-higieniczne ścieków odzwierzęcych.* Pr. Komis. Nauk Rol. i Biol. BTN, 24, 43÷88. 1986.
6. **Kołacz R., Dobrzański Z.:** *Higiena i dobrostan zwierząt gospodarskich.* Wydaw. AR, Wrocław 2006.
7. **Krapac I. G., Dey W. S., Roy W. R., Smyth C. A., Storment E., Sargent S. L., Steele J. D.:** *Impact of swine manure pits on groundwater quality.* Environ. Pollut., 120, 475÷492. 2002.
8. **Kutera J.:** *Rolnicze wykorzystanie gnojowicy – zalecenia.* Materiały instruktażowe nr 23, IMUZ, Falenty 1977.
9. **Maćkowiak Cz.:** *Gnojowica, jej właściwości i zasady stosowania z uwzględnieniem ochrony środowiska.* Materiały szkoleniowe 75/99. Wydaw. IUNG. Puławy 1999.
10. **Olszewska H.:** *Aspekty higieniczne rolniczego wykorzystania gnojowicy.* Rozprawy 116. Wydaw. Uczeln. ATR. Bydgoszcz 2005.
11. **Olszewska H., Gawrysiak A.:** *Wpływ warunków termiczno-wilgotnościowych na tempo inaktywacji paciorkowców grupy D w glebach skażonych gnojowicą z zawiesiną bakterii wskaźnikowych.* Pr. Komis. Nauk Rol. i Biol. BTN, 49, 49÷57. 2007.
12. **Olszewska H., Paluszak Z., Szejniuk B.:** *Przeżywalność Salmonella enteritidis w warunkach laboratoryjnych w glebie, gnojowicy i ścieku komunalnym.* Rocz. Nauk. Zoot. 26, 275÷285. 1999.
13. **Olszewska H., Paluszak Z., Szejniuk B.:** *Badania przeżywalności drobnoustrojów Salmonella enteritidis w gnojowicy, ścieku bytowym i wodzie w warunkach laboratoryjnych.* Problemy higieny w ekologizacji rolnictwa. Wydaw. Fundacja Rozwój SGGW. Warszawa 1997.

14. **Ostrowska A., Gawliński S., Szczubialka Z.:** *Metody analizy i oceny właściwości gleb i roślin.* Wydaw. IOŚ, Warszawa 1991.
15. **Plachá I., Venglovský J., Sasáková N., Svoboda I. F.:** *The effect of summer and winter seasons on the survival of Salmonella typhimurium and indicator micro-organisms during the storage of solid fraction of pig slurry.* J. Appl. Microbiol. 91, 1036÷1043. 2001.
16. **Puchalski A., Kolasa A., Dec M., Urban-Chmiel R., Kowalczyk-Pecka D.:** *Charakterystyka elektroforetyczna białek błony zewnętrznej szczepów Salmonella Enteritidis hodowanych w zróżnicowanych warunkach oraz ocena ich właściwości antygenowych.* Medycyna Wet., 64, 193÷196. 2008.
17. **Smoliński S., Wilczewski E., Andrzejewska J.:** *Występowanie bakterii z rodzaju Escherichia i Salmonella w glebie pozaryzosferowej i ryzosferowej upraw nawożonych gnojowicą.* Pr. Komis. Nauk Rol. i Biol. BTN, 39, 337÷344. 2004.
18. **Wroński G., Szejniuk B., Affelska M.:** *Wpływ preparatu EM na przeżywalność bakterii wskaźnikowych Salmonella Senftenberg W<sub>775</sub> w gnojowicy bydłowej.* Woda, Środowisko, Obszary Wiejskie, 10, 223÷231. 2010.

## Survival Rate of *Salmonella* Enteritidis in Pig Slurry

### Abstract

The aim of this study was to estimate in a model research the survival rate and the elimination rate of the indicator bacteria *Salmonella* Enteritidis in slurry derived from a pig-breeding farm. Laboratory analyses were carried out at temperatures of 4°C and 20°C in two replications. A suspension of the tested bacteria *Salmonella* Enteritidis was introduced into slurry placed in a glass vessel with a volume of 6 liters. To do so, colonies of *Salmonella* bacilli from two Petri dishes were dissolved in 20 ml of Ringer's solution with peptone, and the concentration of bacteria was determined at a level of  $8.0 \cdot 10^8$  MPN/cm<sup>3</sup>, using a densitometer. The suspension obtained was added to the whole volume of slurry and then mixed thoroughly. From all the sample, 1 liter was intended for initial physico-chemical analyses. The other 5 liters were placed in two glass bioreactors 2.5 liter each, which were placed in chambers with temperatures of 4°C and 20°C. Quantitative determination of the test bacteria in particular samples was made by means of the MPN method for the three tube set. The identification of *Salmonella* bacilli was carried out according to the norm PN-ISO 6579:1998. The survival rate of the test bacteria was determined based on an

analysis of the course of linear regression lines characterizing the dynamics of quantitative changes in *Salmonella* Enteritidis bacilli in the examined samples.

The study indicated that as early as in the first week after placing the samples in varied thermal conditions, there was a decrease in the number of tested bacteria by two powers in slurry stored at 20°C in comparison with the initial results. Next quantitative examination of this samples in the second week showed a slight decrease in the number of *Salmonella*, whereas in the fourth week their presence was no more detected. The ambient temperature 4°C, in turn, favored a slower elimination of the examined microorganisms. In the subsequent weeks of the study, a gradual, even reduction in the number of *Salmonella* bacilli occurred. The presence of the tested microorganisms was not observed in this sample only in the 8<sup>th</sup> week.

Summing up the obtained results of the study, it should be stated that the survival rate of *Salmonella* Enteritidis depended on the thermal conditions in which the samples were collected. On the basis of a statistical analysis it was found that the survival time of the indicator bacteria in a sample of slurry stored at 20°C was 4.5 week, whereas for 4°C it was extended up to 10.7 week. The week's elimination rate of the test bacteria at 20°C amounted to 2.54 log, whereas at 4°C it was low and assumed a value of 0.94 log.

