

沙门氏菌在福建省主要土壤中的存活动态及其影响因子研究

张桃香¹, 杨文浩²

(1. 福建农林大学林学院, 福州 350002;

2. 福建农林大学资源与环境学院, 福建省土壤环境健康与调控重点实验室, 福州 350002)

摘要: 沙门氏菌是引发土壤生物污染和食源性疾病爆发的首要病原菌。以福建省几种主要土壤为研究对象, 研究沙门氏菌在土壤中的存活动态及其主控因子, 为评估福建省土壤中沙门氏菌存活可能导致的环境和生态风险提供科学依据。结果表明: (1) 土壤中沙门氏菌的存活数量随时间均呈现出逐步下降的趋势, 通过 Weibul 单指数模型计算得出沙门氏菌在水稻土中存活最长, 且沙门氏菌在不同土壤中的存活时间顺序为: 水稻土>潮土>滨海风沙土>紫色土>红壤>黄壤; (2) 土壤 pH 与土壤有机质含量是影响沙门氏菌在福建农业土壤中的存活的主控因子。可见沙门氏菌在福建省 6 种主要土壤中的存活时间较长, 均有污染农作物和地下水的风险。

关键词: 土壤; 沙门氏菌污染; 存活; 动态; 影响因子

中图分类号: S154.3

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2016)06-0946-05

Salmonella and factors influencing its survival in agricultural soil in Fujian Province

ZHANG Taoxiang¹, YANG Wenhao²

(1. Forestry College, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002;

2. Fujian Provincial Key Laboratory of Soil Environmental Health and Regulation, College of Resources and Environment, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002.)

Abstract: *Salmonella* is a main pathogen that threatens the public health through biological pollution in the soil and foodborne disease outbreak. Hence, understanding the survival mechanisms in agriculture soil and factors affecting the survival of *Salmonella* will help estimate its environmental and ecological risks. The results showed that: (1) the *salmonella* population declined in all tested soils before reaching the detection limit. The survival time of *salmonella* in different soils was in the order of paddy soil > moisture soil > aeolian sandy soil > purple soil > red soil > yellow soil; (2) the soil pH and soil organic matter content were the main control factors influencing the survival of *salmonella* in Fujian agricultural soil. The results indicated that the survival time of *salmonella* in Fujian agricultural soil is long; therefore it could be a risk for polluting crops and underground water.

Key words: soil; *Salmonella* pollution; survival; dynamic; influencing factors

畜禽粪肥农田施用是我国农业上有机废弃物资源化利用的主要途径^[1]。畜禽粪便含有大量的病原微生物和虫卵, 如沙门氏菌、大肠杆菌、黄曲霉素、志贺氏菌和蛔虫卵等^[1-2], 这些富含有害病原微生物和寄生虫卵的畜禽粪便通过施肥进入自然环境中, 并在土壤和水体中长期存活, 导致土壤和水体的生物污染, 还可以从植物根系迁移至植物组织内, 然后通过食物链对农产品安全和人类健康构成威

胁^[3-5]。目前有关畜禽粪便随意排放导致的病原微生物生物污染的负面报道已经屡见不鲜^[4-7]。

沙门氏菌是一种常见的人畜共患病原菌, 是世界报道最多引起食源性疫情爆发的首要病原菌^[8-9]。进食被沙门氏菌污染的食品可引起伤寒、腹泻及肠道炎症反应, 甚至死亡^[9]。据统计, 沙门氏菌是我国食源性疾病的主要病原体, 我国发生的细菌性食物散发中毒事件中有 80% 左右由沙门氏菌引

收稿日期: 2016-05-05

基金项目: 国家自然科学基金项目“生物炭对红壤中沙门氏菌迁移和滞留的研究 (41501272) 和福建农林大学林学院青年科学基金“森林土壤对大肠杆菌吸附规律及粪肥添加响应”(6112C035002)共同资助。

作者简介: 张桃香, 博士, 讲师。E-mail: xsnzhedat2009@163.com

* 通信作者: 杨文浩, 博士, 讲师。E-mail: whyang@fafu.edu.cn

起^[10]。牛、羊、猪和鸡等动物是沙门氏菌的天然宿主,沙门氏菌主要是通过畜禽粪便进行传播^[11-12]。带菌的畜禽间歇排出沙门氏菌时间可长达一年以上甚至终身排菌,且被感染的动物粪便中沙门氏菌含菌率为 $10^3 \sim 10^6$ CFU·g⁻¹,甚至高达 10^7 CFU·g⁻¹^[13],因此畜禽粪便是沙门氏菌污染环境 and 食品的主要来源与传播介质。

研究表明沙门氏菌的传播途径为:携带沙门氏菌的粪便未经灭菌处理直接排放入土壤后,经过雨水冲刷污染地表水,运移能力强的沙门氏菌还能迁移进入地下水,污染地下饮用水源。同时,沙门氏菌还可以通过根系进入植株体内,间接污染蔬菜和水果等^[14]。在我国每年产生大量畜禽粪便,大部分作为有机肥未经无害化处理直接施入农耕土壤,根据预测 2020 年中国畜禽粪便总量将达到 45 亿 t^[15],因此畜禽粪便施用已成为沙门氏菌污染致病的主要原因。目前,我国还没有统一的土壤中沙门氏菌污染的环境标准,但是沙门氏菌在土壤中的广泛存在以及低剂量感染已经给人类健康带来严重的威胁。

通过畜禽粪便施用进入土壤的沙门氏菌可以长期地滞留在土壤中,且保持较高活性,是造成水体和植物长期污染的二次污染源^[4-5]。至今已在福建、江西、广东、安徽、江苏和湖南等多个省份的畜禽粪便、土壤、水和植物等样品中检测出沙门氏菌,并在福建省多个地区发生了由沙门氏菌感染的食源性人畜共患散发疫情^[16-19]。因此,研究福建省主要土壤中沙门氏菌的存活动态以及主控因子对于降低农业生产中生物污染风险和疾病的防控工作具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

供试病原菌为革兰氏阴性沙门氏菌,属于需氧及兼性厌氧菌,其最适生长温度为 37℃,沙门氏菌抗利福平驯化浓度为 120 μg·mL⁻¹。试验中的沙门氏菌均培养 12 h 后用于土壤中沙门氏菌存活的培养试验。保存的沙门氏菌菌株活化后在脑心萃取液培养基(添加 100 μg·mL⁻¹利福平)中恒温振荡培养(37.0℃, 250 r·min⁻¹) 12 h 至沙门氏菌达到对数生长期初期,无菌磷酸缓冲液多次离心洗净沙门氏菌表面的培养基,无菌水稀释一定倍数后用紫外分光光度计测定其浓度,调节菌液浓度至 OD (optical density) 值大约为 0.7,此时的细菌浓度为 1.0×10^8 CFU·mL⁻¹。

1.2 供试土壤

考虑福建省主要土壤类型,主要采集水稻土,红壤,黄壤,紫色土,潮土和滨海风沙土。每个土壤均采集了 3 个重复样品,每个样品均为 S 型多点采集土壤表层土层(0~20 cm)的混合样,用四分法取适量用冰袋包装带回实验室后,人工除去植物残体、根系和石块等,研磨过 2 mm 筛,一半样品 4℃ 冰箱中保存用于接种沙门氏菌的存活试验。另一半风干后过 60 目和 100 目筛,用于其物理化学性质的测定。土壤酸碱度(pH)、土壤有机质(SOC)、总氮(TN)、全磷(TP)、全钾(TK)、可溶性碳(DOC)、粘粒(Clay)、粉粒(Silt)和沙粒(Sand)参照南京土壤研究所(1983)编的《土壤农化分析》进行分析,土壤基本理化性质列于表 1。

表 1 供试土壤物理化学性质

Table 1 Physical and chemical properties of the soils used in this study

土壤 Soil	pH	土壤有 机质/% SOC	总氮/% TN	全磷/% TP	全钾/% TK	可溶性碳 /mg·kg ⁻¹ DOC	粘粒/% Clay	粉粒/% Silt	沙粒/% Sand
水稻土 Paddy soil	6.61	2.58	0.16	0.04	2.65	62.42	25.18	26.83	48.09
红壤 Red soil	4.84	1.37	0.11	0.02	1.28	28.55	52.14	33.75	13.89
黄壤 Yellow soil	5.15	1.80	0.12	0.03	0.61	47.68	39.66	17.26	43.08
紫色土 Purple soil	5.58	1.57	0.10	0.07	2.83	29.39	12.39	24.31	63.30
潮土 Moisture soil	5.71	2.85	0.16	0.12	2.56	74.06	21.64	24.49	53.87
风沙土 Aeolian sandy soil	5.68	0.86	0.04	0.02	0.75	6.86	7.74	0.22	92.04

1.3 测定方法

将一定量沙门氏菌接种至土壤,使得土壤中沙门氏菌的最终浓度为 10^7 CFU·g⁻¹,然后 25℃ 恒温培养箱中避光培养,实验同时进行 3 个平行和空白处理,分别在培养 0、1、2、3、5、7、10、15、20、

25、30、35 和 40 d 后取样测定:称取土样于离心管中,加入一定量 0.1% 蛋白胍缓冲液分散混匀,吸取 100 μL 土壤悬浮液逐级稀释到适当浓度,涂抹至大豆酪蛋白琼脂培养基(添加 100 μg·mL⁻¹利福平),随后放入 37℃ 培养箱培养过夜后计数,计算

出在相应时间点土壤中沙门氏菌的浓度。连续 2 次都未能在土壤中检测出沙门氏菌菌落时,停止取样。

1.4 统计方法

沙门氏菌在土壤中的存活浓度转化为 $\log_{10}(\text{CFU}\cdot\text{g}^{-1})$, 然后通过 Weibull 单指数模型^[20]模拟:

$$\log_{10}(Nt) = \log_{10}(N0) - (t/\delta)^p$$

其中 Nt 为取样时土壤中沙门氏菌的浓度, $N0$ 为土壤中沙门氏菌接种浓度, t 为取样时间, δ 为尺度参数, p 为弧度参数($p > 1$, 拟合曲线为凸状, $p < 1$, 拟合曲线为凹状)。

采用 SPSS18.0 软件进行相关分析和多元逐步回归分析。图件制作采用 Origin8.1 软件。

2 结果与分析

2.1 沙门氏菌在土壤中的存活动态

沙门氏菌在土壤中的存活动态随时间的变化如图 1 所示。水稻土、红壤、黄壤、紫色土、潮土和滨海风沙土中沙门氏菌的浓度随培养时间延长而逐渐下降, 但是不同土壤中沙门氏菌浓度随着时间变化的趋势有明显不同。水稻土和潮土中沙门氏菌的存活浓度在培养后的前 7 d 处于一个相对稳定期, 沙门氏菌的浓度下降较缓慢, 随后逐步进入较快的消亡期, 培养 20 d 后土壤中沙门氏菌的浓度为 $10^4 \sim 10^5 \text{CFU}\cdot\text{g}^{-1}$, 接种后 30 d 水稻土和潮土中沙门氏菌才逐步接近最低检测线 ($10^2 \text{CFU}\cdot\text{g}^{-1}$)。滨海风沙土和紫色土中沙门氏菌的衰亡速率快于水稻土和潮土, 接种后前 3 d 处于相对稳定期, 然后进入衰亡期, 接种 7 d 后, 土壤中病原菌的浓度下降至 $10^5 \text{CFU}\cdot\text{g}^{-1}$ 左右, 紫色土和风沙土中沙门氏菌浓度分别在接种 15 d 和 20 d 后迅速下降至最低检测线。黄壤和红壤中沙门氏菌的存活动态较为相似, 接种后没有经过相对稳定期直接进入快速衰亡期, 且在接种 1 d 后, 黄壤和红壤中沙门氏菌的浓度下降至 $10^5 \sim 10^6 \text{CFU}\cdot\text{g}^{-1}$, 10 d 后土壤中基本检测不到沙门氏菌。

2.2 沙门氏菌在土壤中的存活模型

沙门氏菌在水稻土, 红壤, 黄壤, 紫色土, 潮土和滨海风沙土中的存活方程决定系数 (R^2) 范围为 0.95~0.99, 说明 Weibull 单指数模型能比较好的拟合沙门氏菌在福建省 6 种农业土壤中的存活动态。由表 2 所示, δ (尺度参数) 的范围为 0.43~15.03, p (弧度参数) 的范围为 0.51~1.83, 且水稻土、潮土和滨海风沙土的 p 值均大于 1, 紫色土、红壤和黄壤的 p 值小于 1, 说明沙门氏菌在紫色土, 红壤和黄壤中的衰亡速率快于水稻土, 潮土和滨海

风沙土。通过 Weibull 单指数模型计算得出土壤中存活时间最长的土壤为水稻土 (图 2), 存活时间为 33.23 d; 存活时间最短的土壤为黄壤, 存活时间仅为 10.05 d。沙门氏菌在福建省不同农业土壤中的存活时间顺序为: 水稻土 (33.23 d) > 潮土 (30.18 d) > 滨海风沙土 (21.06 d) > 紫色土 (16.00 d) > 红壤 (12.24 d) > 黄壤 (10.05 d) (图 2)。

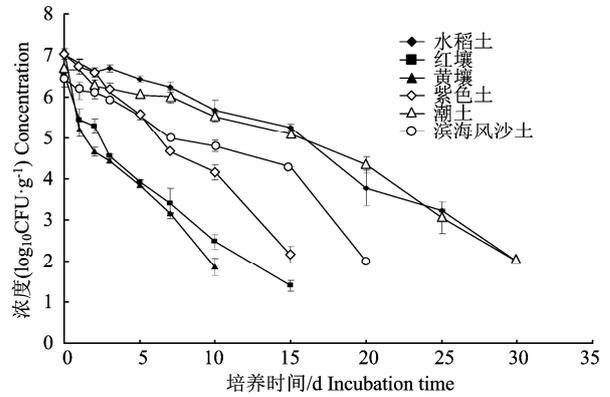


图 1 土壤中沙门氏菌的存活动态

Figure 1 Survival dynamic of *Salmonella* in soils

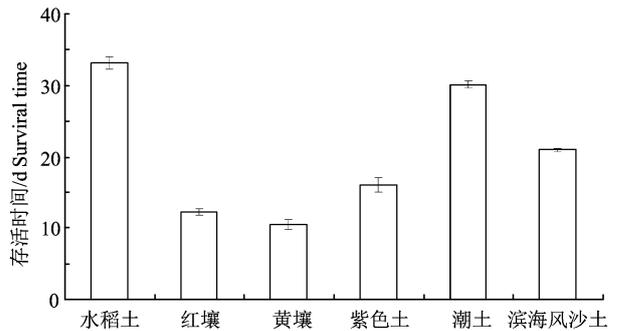


图 2 土壤中沙门氏菌存活时间

Figure 2 The survival time needed to reach the detection limit for *Salmonella* in the soils

表 2 Weibull 模型拟合参数

Table 2 Fitted parameter values of the Weibull model

土壤类型 Soil type	δ	p	R^2
水稻土 Paddy soil	15.03±0.17	1.83±0.02	0.98±0.01
红壤 Red soil	1.09±0.06	0.63±0.02	0.98±0.01
黄壤 Yellow soil	0.43±0.05	0.51±0.02	0.98±0.02
紫色土 Purple soil	2.43±0.22	0.90±0.05	0.98±0.01
潮土 Moisture soil	11.69±0.16	1.58±0.04	0.98±0.02
滨海风沙土 Coastal sandy soil	7.99±0.45	1.49±0.07	0.95±0.01

2.3 沙门氏菌存活与土壤理化性质的关系

本实验通过相关分析和多元逐步回归对沙门氏菌存活与土壤性质间的关系进行了综合探讨。简单相关分析结果表明(表 3), 沙门氏菌的存活时间与

土壤的 pH 值 ($r=0.861$) 成极显著正相关, 与有机碳($r=0.697$)和可溶性碳 ($r=0.585$) 呈显著正相关, 且与粘土矿物含量 ($r=-0.634$) 呈显著的负相关。

回归方程分析可以分析各土壤理化性质对沙门氏菌在土壤中的存活时间的影响作用, 沙门氏菌存活时间与土壤性质的多元逐步回归参数见表 4, 得到的二元一次方程为: $t_d = -42.57 + 9.67(pH)$

$+4.90(SOC)$, 模型拟合的决定系数 R^2 为 0.94, P 值小于 0.01, 方程拟合效果较好, 具有统计学意义。方程中只保留了 pH 和土壤有机质 2 个自变量, 其他自变量均从方程中剔除掉, 且 pH 和 SOC 均与沙门氏菌在土壤中的存活时间因变量 t_d 呈显著正相关, 说明 pH 和土壤有机质含量是影响福建省农业土壤中沙门氏菌存活的主要控制因素。

表 3 存活时间与供试土壤性质相关性分析

Table 3 Pearson's correlation coefficients between *Salmonella* survival time and properties of the soils

项目 Item	pH	有机质 SOC	总氮 TN	全磷 TP	全钾 TK	可溶性碳 DOC	粘粒 Clay	粉粒 Silt	沙粒 Sand
t_d	0.861**	0.697*	0.168	0.353	0.466	0.585*	-0.637*	0.039	0.396

表 4 沙门氏菌存活时间与土壤性质之间多元逐步回归

Table 4 Stepwise multiple-linear regression analysis of *Salmonella* survival time with properties of the soils

回归方程 Regression equation	R^2	F 值 F value	T 值 T value
$t_d = -42.57 + 9.67(pH) + 4.90(SOC)$	0.94	33.09***	常数 Constant -4.64*** pH 5.45*** 有机质 SOC 3.24***

3 讨论与结论

研究表明, 接种至福建省 6 种主要土壤中的沙门氏菌的浓度随着培养时间的延长而逐渐下降, 且不同的土壤中沙门氏菌衰亡的趋势有明显不同。沙门氏菌存活动态可通过 Weibull 单指数模型得到较好的模拟, 沙门氏菌在不同土壤中的存活时间顺序为: 水稻土 > 潮土 > 滨海风沙土 > 紫色土 > 红壤 > 黄壤。水稻土是福建省最主要的农业土壤, 全省水稻土面积 1606 万亩, 沙门氏菌在水稻土中存活时间长达 30 多天, 说明通过施肥和污水灌溉进入水稻土的沙门氏菌在土壤中的蓄积时间较长。如果人或动物直接接触被沙门氏菌污染的土壤, 或者食用土壤中被污染的蔬菜和水果等会有感染沙门氏菌疫情的风险, 而且被沙门氏菌污染的土壤经过雨水冲刷不仅会污染地表水, 还能让运移能力强的沙门氏菌从土壤中迁移进入地下水, 污染地下饮用水源^[21]。据报道, 施肥后常见的耕耘以及第一次降雨会转移大量的病原菌到地下水中, 对病原菌的迁移起到了非常大的促进作用^[13,22]。研究表明, 施肥后土壤中的沙门氏菌在数小时之内以高浓度迁移至地下水, 且在地下水中保持活性长达几个月^[23-24]。本实验中检测的水稻土、红壤、黄壤、紫色土、潮土和滨海风沙土中的沙门氏菌的存活时间均在 10 d 以上, 说明本实验中所用到的福建省 6 种主要土壤在施肥后均有污染地表水和地下水的风险。

相关分析和多元逐步回归证明了土壤 pH 与土壤有机质含量是影响沙门氏菌在福建主要农业土壤中存活的主控因子。沙门氏菌适应中性和微碱性环境, 在这个范围内沙门氏菌可以适应不断变化 pH 值, 土壤细菌数量会随着 pH 值的升高而增多^[25]。土壤有机质是土壤中沙门氏菌存活的主要能量和营养物质来源, 而且有机质含量较高的土壤中大小孔隙更丰富, 可以为病原菌提供足够的氧气^[26]。大量研究已经证明了有机质对土壤中沙门氏菌存活的促进作用^[13,27-28]。因此 pH 较高和富含有机质的土壤中沙门氏菌的衰亡速度会慢于其他土壤, 其生物污染风险应该引起重视。

参考文献:

- [1] 高定, 陈同斌, 刘斌, 等. 我国畜禽养殖业粪便污染风险与控制策略[J]. 地理研究, 2006, 25(2): 311-319.
- [2] UNC A, GOSS M J. Transport of bacteria from manure and protection of water resources [J]. Appl Soil Ecol, 2004, 25(1): 1-18.
- [3] 陈欣, 常志州, 袁生, 等. 畜禽粪便中人畜共患病原菌对蔬菜污染的研究[J]. 江苏农业科学, 2007, 35(5): 238-241.
- [4] 孔源, 韩鲁佳. 我国畜牧业粪便废弃物的污染及其治理对策的探讨[J]. 中国农业大学学报, 2002, 7(6): 92-96.
- [5] HANNING I B, NUTT J D, RICKE S C. Salmonellosis outbreaks in the United States due to fresh produce: sources and potential intervention measures[J]. Foodborne Pathog Dis, 2009, 6(6): 635-648.

- [6] 王世杰, 杨杰, 谌志强, 等. 1994-2003年我国766起细菌性食物中毒分析[J]. 中国预防医学杂志, 2006, 7(3): 180-184.
- [7] 叶小梅, 常志州, 陈欣, 等. 畜禽养殖场排放物病原微生物危险性调查[J]. 生态与农村环境学报, 2007, 23(2): 66-70.
- [8] SATURVEITHAN C, ARIEFF A, PREMGANESH G, et al. *Salmonella* osteomyelitis in a one year old child without sickle cell disease: A case report[J]. Malays Orthop J, 2014, 8(2): 52-54.
- [9] ANGELO K M, CHU A, ANAND M, et al. Outbreak of *Salmonella* newport infections linked to cucumbers--United States, 2014[J]. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2015, 64(6): 144-147.
- [10] WANG Y, YANG B, WU Y, et al. Molecular characterization of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis on retail raw poultry in six provinces and two National cities in China[J]. Food Microbiol, 2015, 46: 74-80.
- [11] HUONG L Q, FORSLUND A, MADSEN H, et al. Survival of *Salmonella* spp. and fecal indicator bacteria in Vietnamese biogas digesters receiving pig slurry[J]. Int J Hyg Environ Health, 2014, 217(7): 785-795.
- [12] NICHOLSON F A, GROVES S J, CHAMBERS B J. Pathogen survival during livestock manure storage and following land application[J]. Bioresour Technol, 2005, 96(2): 135-143.
- [13] SEMENOV A V, VAN OVERBEEK L, VAN BRUGGEN A H. Percolation and survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in soil amended with contaminated dairy manure or slurry[J]. Appl Environ Microbiol, 2009, 75(10): 3206-3215.
- [14] BRADFORD S A, MORALES V L, ZHANG W, et al. Transport and fate of microbial pathogens in agricultural settings[J]. Crit Rev Env Sci Tec, 2013, 43(8): 775-893.
- [15] 张淑芬, 韩永胜. 农村畜禽粪便污染现状与治理措施[J]. 当代畜牧, 2014(11): 38-39.
- [16] 李秀桂, 郭云昌, 吕素玲, 等. 2005年广西食源性沙门氏菌污染监测分析[J]. 应用预防医学, 2008, 14(1): 4-7.
- [17] 王晓泉, 焦新安, 刘晓文, 等. 江苏部分地区食源性和人源沙门氏菌的多重耐药性研究[J]. 微生物学报, 2007, 47(2): 221-227.
- [18] 陈伟伟, 林升清, 马群飞, 等. 福建省2000—2002年食品中沙门氏菌的监测与分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2003, 15(5): 406-409.
- [19] 温远元, 曾凡伟, 邓富玉, 等. 一起沙门氏菌引起的食物中毒的调查[J]. 预防医学文献信息, 2000, 6(4): 374-375.
- [20] Zhang T, Wang H, Wu L, et al. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in soils from Jiangsu Province, China[J]. PLoS One, 2013, 8(12): e81178.
- [21] Schinner T, Letzner A, Liedtke S, et al. Transport of selected bacterial pathogens in agricultural soil and quartz sand[J]. Water Res, 2010, 44(4): 1182-1192.
- [22] Unc A, Goss M J. Transport of bacteria from manure and protection of water resources [J]. Appl Soil Ecol, 2004, 25(1): 1-18.
- [23] HAZNEDAROGLU B Z, KIM H N, BRADFORD S A, et al. Relative transport behavior of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovar pullorum in packed bed column systems: influence of solution chemistry and cell concentration[J]. Environ Sci Technol, 2009, 43(6): 1838-1844.
- [24] ONGENG D, VASQUEZ G A, MUYANJA C, et al. Transfer and internalisation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in cabbage cultivated on contaminated manure-amended soil under tropical field conditions in Sub-Saharan Africa[J]. Int J Food Microbiol, 2011, 145(1): 301-310.
- [25] FIERER N, JACKSON R B. The diversity and biogeography of soil bacterial communities[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(3): 626-631.
- [26] 马成泽. 有机质含量对土壤几项物理性质的影响[J]. 土壤通报, 1994, 25(2): 65-67.
- [27] ONGENG D, MUYANJA C, GEERAERD AH, et al. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in manure and manure-amended soil under tropical climatic conditions in Sub-Saharan Africa[J]. J Appl Microbiol, 2011, 110(4): 1007-1022.
- [28] SEMENOV A V, VAN OVERBEEK L, TERMORSHUIZEN A J, et al. Influence of aerobic and anaerobic conditions on survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in Luria-Bertani broth, farm-yard manure and slurry[J]. J Environ Manage, 2011, 92(3): 780-787.