

Higiena i Epidemiologia, rok 2022/2023, Biokosmetologia

Izolacja i identyfikacja *Escherichii Coli* w wodzie

Pałeczka okrężnicy

(łac. *Escherichia coli*)

To Gram-ujemna bakteria należąca do rodziny Enterobacteriaceae.

Mikroorganizm ten odkryty został w 1885 roku przez niemieckiego pediatrę i bakteriologa Theodor'a Eschericha.

Escherichia coli wchodzi w skład fizjologicznej flory bakteryjnej jelita grubego człowieka i zwierząt stałocieplnych.

E. coli to pałeczka o długości ok. 2 mikrometrów i średnicy około 0,8 mikrometra, ruchliwa, względnie beztlenowa, mezofilna, nietworząca przetrwalników, rzadko wytwarzają otoczkę.

Fermentuje glukozę, laktozę, maltozę i inne węglowodany z wytworzeniem kwasu lub kwasu i gazu.

Wytwarza indol z tryptofanu, redukuje azotany do azotynów, jest oksydazo-ujemna i katalazo-dodatnia.

Escherichia coli dostaje się do środowiska poprzez:

- Oczyszczalnie ścieków komunalnych
- Oczyszczalnie ścieków przemysłowych
- Spływy obszarowe z terenów miejskich oraz rolniczych
- Drogowe i kolejowe ciągi komunikacyjne

1. *Escherichia coli* NORMA 0/100ml

pałeczka okrężnicy

rodzina *Enterobacteriaceae*

fakultatywnie tlenowa, Gram-ujemna bakteria. Wchodzi w skład fizjologicznej flory bakteryjnej jelita grubego człowieka oraz zwierząt stałocieplnych.

W jelicie uczestniczy w rozkładzie pokarmu, a także przyczynia się do produkcji witamin z grupy B, C oraz K.

Jej obecność w wodzie jest dowodem zanieczyszczenia jej przez kał lub ścieki, wskazuje tym samym na możliwości wystąpienia w wodzie również innych jelitowych bakterii chorobotwórczych.

Chorobotwórczość *E. coli*

Bakterie *E. coli*, które są nieszkodliwe w jelicie, powodują schorzenia innych układów.

- Najczęstszą przyczyną zakażeń układu moczowego.
- Gdy bakterie przedostaną się do jamy brzusznej - ciężkie schorzenie zapalenie otrzewnej. Często powikłaniem zapalenia otrzewnej może być posocznica i wstrząs endotoksyczny.
- Szpitalne zapalenia płuc
- Zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych u noworodków

Chorobotwórczość *E. coli* zależy od jej inwazyjności i możliwości wytwarzania toksyn.

Inwazyjne szczepy tej bakterii mają zdolność wnikania do tkanek i wywoływania odczynów zapalnych.

Najistotniejsze w wywołaniu zachorowań są: enterotoksyna, endotoksyna i neurotoksyna.

Enterotoksyna działając na śluzówkę jelit w połączeniu z endotoksyną powoduje zapalenie jelit i objawy zatrucia.

Neurotoksyna wchłonięta do organizmu z przewodu pokarmowego, prowadzi do wystąpienia charakterystycznych objawów ze strony układu nerwowego (np.: choroba obrzękowa świń)

Organizmy młode są szczególnie narażone na zachorowania – przyjmuje się, że około połowa padnięć zwierząt młodych jest spowodowana kolibakteriozami.

2. Bakterie grupy coli NORMA 0/100ml

(pałeczki Gram – ujemne, oksydazoujemne, wegetatywne, względne beztlenowce, fermentujące laktozę z wytworzeniem kwasu i gazu)

Rodzaj: *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella* (mogą znajdować się zarówno w odchodach jak i w środowisku naturalnym)

- Nie powinny być obecne w uzdatnianej wodzie, a ich wykrycie sugeruje nieodpowiednie uzdatnianie wody, zanieczyszczenie po uzdatnianiu lub nadmierną zawartość substancji odżywczych w wodzie.

Metody identyfikacji i detekcji

- Metoda filtracji membranowej
- Metoda NPL (fermentacji próbkowej)
- Podłoże agarowe Endo (badanie potwierdzające – posiew na podłoże Endo – dokonuje się ze wszystkich dodatnich i wątpliwych hodowli badania wstępnego, uzyskanych po 24 i 48 h.
- Metoda Colilert (metoda najprawdopodobniejszej liczby)

Metoda filtracji membranowej (FM)

- Przy użyciu aparatu filtracyjnego i jałowych filtrów membranowych
- Filtruje się określoną ilość wody w zależności od spodziewanego zanieczyszczenia wody
- Niewielkie ilości wody $\leq 10\text{ml}$ –dolewa się płynu do rozcieńczeń- min 20 ml.
- W jałowy sposób umieszcza się filtr membranowy na płytkę Petriego z agarem Endo zawieszoną bakteryjną do góry
- Inkubacja 37 stopni / 24H
- Liczenie typowych bakterii wyrosłych na filtrze
- Kolonie nietypowe- należy zbadać czy są to Gram ujemne bakterie i wykonać posiew na wtórną fermentację laktozy

OZNACZANIE

metoda filtrów membranowych

- Sterylną pęsetą membranę z acetylocelulozy o porach wielkości $0,45\text{ }\mu\text{m}$ i umieścić ją kratkowaną stroną na podstawie części filtrującej;
- 100 ml wody przefiltrować przez membranę, wykorzystując pompę próżniową lub wodną
- Bakterie zatrzymane na membranie; przenieść membranę stroną kratkowaną do góry na odpowiednie agarowe podłoże na płytkach Petriego.

Escherichia coli i bakterie grupy coli

- Endo z fuksyną (Endo-FM)
- Inkubacja w temp 37°C 24 – 48h (coli) 44°C 24h (*Escherichia coli*)
- Typowe kolonie ciemno-purpurowe z metalicznym połyskiem

Clostridium perfringens

- Przed filtracją 20 min do łaźni wodnej ogrzanej do 80°C . Ma to na celu zabicie form wegetatywnych
- Agar + agar siarczynowo-żelazawy
- Inkubacja w temp 37°C 24 – 48 h, odwrócone denkiem do góry
- na pożywkę z posiewem wlać rozpuszczonego ok. 20 cm^3 agaru siarczynowo-glukozowo-żelazawego i agaru do poziomu ok. 2 mm poniżej górnej krawędzi ściany denka – warunki beztlenowe;
- po zastygnięciu odwrócić denkiem do góry

- Typowe kolonie czarna obwódka wokół kolonii