**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 układ nerwowego (np.: choroba obrzękowa świń)

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

1. **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 uzdatniane 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 sie ze wszystkich dodatnich i wątpliwych hodowli badania wstępnego, uzyskanych po 24 i 48 h.
* Metoda Colilert (metoda najprawdopodobnej 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 ≤ 10ml –dolewa się płynu do rozcieńczeń- min 20 ml.
* W jałowy sposób umieszcza się filtr membranowy na płytkę Petriego z agarem Endo zawiesiną 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 µm 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 37oC 24 – 48h (coli) 44oC 24h (*Escherichia coli*)
* Typowe kolonie ciemno-purpurowe z metalicznym połyskiem

*Clostridium perfringens*

* Przed filtracją 20 min do łaźni wodnej ogrzanej do 800C. Ma to na celu zabicie form wegetatywnych
* Agar + agar siarczynowo-żelazawy
* Inkubacja w temp 37oC 24 – 48 h, odwrócone denkiem do góry
* na pożywkę z posiewem wlać rozpuszczonego ok. 20 cm3 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