



Πολυτεχνείο Κρήτης- Τμήμα Μηχανικών Περιβάλλοντος
Εργαστήριο Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας , 2^ο Εξάμηνο

10
04

Ομάδα 15

3^η Εργαστηριακή Άσκηση

ΒΑΣΙΚΕΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΣΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ΤΩΝ ΥΔΑΤΩΝ

Ημερομηνία : 13 Μαρτίου 2018

Μέλη: Ευαγγέλου Παναγιώτης

Αυξεντίου Λουκής

Ολύμπιος Πέτρος

Χατζηαθανασίου Χρύσω

Κανναβιάς Χρύσανθος

Εισαγωγή

Σκοπός αυτής της εργαστηριακής άσκησης είναι η εξέταση της ποιότητας του νερού με βάση τον βαθμό της βακτηριακής μόλυνσης. Η μέθοδος που χρησιμοποιήσαμε είναι η διήθηση δείγματος νερού υπό κενό με μεμβράνη μεγέθους πόρων 0,45 μm . Σε αυτήν εργαστηριακή άσκηση ελέγξαμε την συγκέντρωση των βακτηρίων κοπρανώδεις εντερόκοκκου και *Escherichia coli*.

Η πυκνότητα των κολοβακτηρίδιων στο μολυσμένο νερό παρουσιάζετε ανάλογη του βαθμού περιττωματικής μόλυνσης. Παράλληλα η παρουσία κολοβακτηρίδιων είναι αυτή που φανερώνει την παρουσία και άλλων παθογόνων μικροοργανισμών. Ωστόσο τα κολοβακτηρίδια καθίστανται περισσότερο ανθεκτικά σε σχέση με τα υπόλοιπα βακτήρια που προκαλούν ασθένειες και αυτό έχει σαν αποτέλεσμα η απουσία τους από το νερό να υποδεικνύει ότι το νερό είναι βακτηριολογικά ασφαλές για ανθρώπινη κατανάλωση. Σε αυτό το σημείο αξίζει να σημειωθεί ότι η εξέταση του νερού για την παρουσία εντερικών παθογόνων μικροοργανισμών θεωρείται από πολύ δύσκολη έως αδύνατη σε αντίθεση με την ανίχνευση εντερικών μη παθογόνων μικροοργανισμών οι όποιοι υπό κανονικές συνθήκες βρίσκονται στο έντερο και όχι στο χώμα ή στο νερό οπότε αν ανιχνευτούν στο νερό πρόκειται για κοπρανώδη μόλυνση.

Υλικά

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή του πειράματος ήταν:

1. Συσκευή Διήθησης
2. Αντλία
3. Επωαστικός Θάλαμος
4. Μεμβράνες 0,45μm
5. Τρυβλία
6. Θρεπτικό Υλικό T.B.X ή HiCrome Coliform Agar για την *Escherichia Coli* και Θρεπτικό Υλικό Slanetz and Bartley medium για τον Κοπρανώδη Εντερόκοκκο.

Πειραματική Διαδικασία:

Στην αρχή, χρησιμοποιώντας το φλόγιστρο, αποστειρώνουμε τη λαβίδα και τη σπάτουλα την οποία θα χρησιμοποιήσουμε. Ακολούθως, προχωράμε στη διήθηση 100ml νερού υπό μεμβράνη με μέγεθος πόρων 0,45 μm, υπό πίεση. Επαναλαμβάνουμε τη διαδικασία αυτή 2 φορές ώστε να έχουμε δύο μεμβράνες προς μελέτη. Χρησιμοποιώντας την αποστειρωμένη σπάτουλα και την λαβίδα, τοποθετούμε τη μεμβράνη μέσα στο τρυβλίο όπου υπάρχει θρεπτικό υλικό. Στο ένα τρυβλίο υπάρχει θρεπτικό υλικό που ενισχύει τη επώαση της *Escherichia Coli* (HiCrome Coliform Agar), ενώ στο άλλο τρυβλίο, θρεπτικό υλικό που ενισχύει την επώαση του Κοπρανώδη Εντερόκοκκου (Slanetz and Bartley medium). Στη συνέχεια, τοποθετούμε το τρυβλίο της *Escherichia Coli* στον επωαστικό θάλαμο στους $44^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ για 21 ώρες ± 3 ώρες ενώ το τρυβλίο του Κοπρανώδη Εντερόκοκκου στους $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ για 44 ώρες ± 4 ώρες. Μετά την επώαση του Κοπρανώδη Εντερόκοκκου εάν έχουν αναπτυχθεί τυπικές αποικίες (καφέ, κόκκινο ή ροζ χρώματος) μεταφέρουμε τη μεμβράνη διήθησης σε θρεπτικό υλικό Bile-aesculin-azide agar το οποίο έχει προθερμαθεί στους $44^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ και το αφήνουμε σε αυτή τη θερμοκρασία, για επώαση, για 2 ώρες. Όταν γίνει η επώαση των μικροοργανισμών και στα δύο τρυβλία, καταμετρούμε τις αποικίες. Οι αποικίες *E.coli* στη μεμβράνη διήθησης έχουν σκούρο μπλε-μωβ χρώμα, ενώ οι αποικίες του Κοπρανώδη Εντερόκοκκου έχουν μαύρο διάχυτο χρώμα.

Αποτελέσματα

Αρχικά, οι αποικίες που μετρήθηκαν για το κάθε τρυβλίο είναι:

Κοπρανώδεις Εντερόκοκκοι: 277

Escherichia coli : 23

Συγκεκριμένα, στο τρυβλίο κοπρανώδεις εντερόκοκκους, όπου υπήρχε θρεπτικό υλικό, οι αποικίες είχαν σκούρο κόκκινο χρώμα ενώ στο τρυβλίο με την E. Coli, η οποία αναπτύχθηκε σε κίτρινο θρεπτικό υλικό, οι αποικίες εμφανίζονταν με μπλε και πράσινο χρώμα.

Σχήμα 1. Μικροβιολογικές παράμετροι για πόσιμο νερό

Μικροβιολογικές παράμετροι	
Παράμετρος	Παραμετρική τιμή (αριθμός/100 ml)
Escherichia coli (E. coli)	0
Εντερόκοκκοι	0
Για το νερό που πωλείται σε φιάλες ή δοχεία, ισχύουν τα ακόλουθα:	
Παράμετρος	Παραμετρική τιμή
Escherichia coli (E. coli)	0/250 ml
Εντερόκοκκοι	0/250 ml
Pseudomonas aeruginosa	0/250 ml
Αριθμός αποικιών σε 22 °C	100/ml
Αριθμός αποικιών 37 °C	20/ml

Σχήμα 2. Μικροβιολογικές παράμετροι για νερό αναψυχής

Για τα εσωτερικά ύδατα

	A	B	Γ	Δ	E
	Παράμετρος	Εξαιρετική ποιότητα	Καλή ποιότητα	Επαρκής ποιότητα	Μέθοδοι ανάλυσης αναφοράς
1	Εντερόκοκκοι (cfu/100 ml)	200 (*)	400 (*)	330 (**)	ISO 7899-1 ή ISO 7899-2
2	Κολοβακτηρίδια (cfu/100 ml)	500 (*)	1 000 (*)	900 (**)	ISO 9308-3 ή ISO 9308-1

(*) Βάσει αξιολόγησης σύμφωνα με το 95ο εκατοστημόριο. Βλέπε παράρτημα II.

(**) Βάσει αξιολόγησης σύμφωνα με το 90ο εκατοστημόριο. Βλέπε παράρτημα II.

Για τα παράκτια ύδατα και τα μεταβατικά ύδατα

	A	B	Γ	Δ	E
	Παράμετρος	Εξαιρετική ποιότητα	Καλή ποιότητα	Επαρκής ποιότητα	Μέθοδοι ανάλυσης αναφοράς
1	Εντερόκοκκοι (cfu/100 ml)	100 (*)	200 (*)	185 (**)	ISO 7899-1 ή ISO 7899-2
2	Κολοβακτηρίδια (cfu/100 ml)	250 (*)	500 (*)	500 (**)	ISO 9308-3 ή ISO 9308-1

(*) Βάσει αξιολόγησης σύμφωνα με το 95ο εκατοστημόριο. Βλέπε παράρτημα II.

(**) Βάσει αξιολόγησης σύμφωνα με το 90ο εκατοστημόριο. Βλέπε παράρτημα II.

Για τον υπολογισμό των μικροβιολογικών παραμέτρων για το νερό που πωλείται σε φιάλες και δοχεία:

(Τα αποτελέσματα προκύπτουν από την απλή μέθοδο των τριών)

$$\begin{aligned} \text{Κοπρανώδεις Εντερόκοκκοι: } & 100 \quad 277 \\ & 250 \quad x \quad \rightarrow \\ & x = (250 \cdot 277) / 100 = 693 \end{aligned}$$

$$\text{Escherichia coli : } x = (250 \cdot 23) / 100 = 58$$

Παράμετρος	Παραμετρική τιμή (CFU/100mL)
Escherichia Coli (E. coli)	23
Εντερόκοκκοι	277
Για το νερό που διατίθεται στο εμπόριο σε φιάλες ή δοχεία, ισχύουν τα ακόλουθα: (CFU/250mL)	
Escherichia Coli (E. coli)	58
Εντερόκοκκοι	693

Συζήτηση

Σε αυτή την εργαστηριακή άσκηση μελετήθηκε η ποιότητα του νερού σύμφωνα με το βαθμό βακτηριακής μόλυνσης. Αφού πρώτα επεξεργαστήκαμε το νερό που μας δόθηκε ως δείγμα και βρήκαμε τον αριθμό των αποικιών τους, συγκρίναμε τα αποτελέσματά που εξάγαμε με τις μικροβιολογικές παραμέτρους. Βασιζόμενοι στους πίνακες που μας δόθηκαν, στους οποίους βρίσκονται καταγεγραμμένα τα όρια ύπαρξης συγκεκριμένων μικροοργανισμών στο εμφιαλωμένο νερό που διατίθεται στο εμπόριο καθώς και στα εσωτερικά και παράκτια ύδατα, προβήκαμε στα παρακάτω συμπεράσματα.

Σύμφωνα με τον πίνακα βιολογικών παραμέτρων για τα εσωτερικά ύδατα, το νερό δείγμα μας συγκαταλέγεται στα νερά καλής ποιότητας καθώς ενώ ο αριθμός των αποικιών του βακτηρίου *E.coli* βρίσκεται εντός του ορίου του νερού εξαιρετικής ποιότητας (23 CFU/100ml), ο αριθμός αποικιών του βακτηρίου του Εντερόκοκκου βρίσκεται εντός του ορίου του νερού καλής ποιότητας (277 CFU/100ml).

Αναφορικά με τα παράκτια νερά, το νερό δείγμα μας συγκαταλέγεται στα νερά επαρκούς ποιότητας καθώς ενώ ο αριθμός των αποικιών του βακτηρίου *E. Coli* βρίσκεται εντός του ορίου του νερού εξαιρετικής ποιότητας (23 CFU/100ml), ο αριθμός αποικιών του βακτηρίου του Εντερόκοκκου βρίσκεται εντός του ορίου του νερού επαρκούς ποιότητας (277 CFU/100ml).

Οι παράμετροι που καθορίζουν αν το νερό είναι πόσιμο ρυθμίζονται από την παραμετρική τιμή (CFU/100 ml) η οποία ισούται με 0 και για τα δύο βακτήρια (*E. Coli* και Εντερόκοκκος). Σύμφωνα με αυτό, το αποτέλεσμα που προκύπτει είναι ότι το δείγμα μας καθίσταται μη πόσιμο με 23 και 277 CFU/100 ml αντίστοιχα. Η παραμετρική τιμή που υπολογίσαμε υπερβαίνει την προκαθορισμένη τιμή για το νερό που πωλείται σε φιάλες ή δοχεία. Αυτό δικαιολογείται από το γεγονός ότι το νερό παρουσιάζει φαινόμενο κοπρανώδους μόλυνσης. Κάποιοι από τους μικροοργανισμούς όπως για παράδειγμα η *E.Coli* αποτελούν φυσιολογική μικροχλωρίδα του έντερου. Αν όμως παρουσιαστούν σε άλλους ιστούς και όργανα μπορεί να προκαλέσουν μέχρι και το θάνατο. Η παρουσία μεγαλύτερου αριθμού αποικιών εντερόκοκκου παρά αποικιών *E.coli* οφείλεται στο ότι ο εντερόκοκκος αποτελεί βακτήριο Gram (+) κάτι το οποίο το καθιστά πιο

ανθεκτικό στο θαλάσσιο περιβάλλον, ενώ το βακτήριο E. Coli αποτελεί βακτήριο Gram (-).⁽¹⁾

Εν κατακλείδι, το χρώμα που εμφανίζουν οι αποικίες των μικροοργανισμών στα τρυβλία οφείλετε στα θρεπτικά συστατικά τα όποια ενεργοποιούν μεταβολικές διεργασίες, μια από αυτή είναι η έκκριση συγκεκριμένων χρωστικών ουσιών.



Βιβλιογραφία

1.Πιτυρίγκα,Β. Χ.,2016. ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΠΟΣΙΜΟΥ ΝΕΡΟΥ -ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ.Intelligent Deep Analysis