

Projekt MINT

Protokół badawczy

Wymiana Polsko-Niemiecka

Gefördert durch / Projekt dofinansowała



Deutsch-Polnisches Jugendwerk
Polsko-Niemiecka Współpraca Młodzi

Zespół badawczy: Łukasz Łapiński, Stanisław Kossakowski, Mateusz Nitkowski

Opiekunowie zespołu: Marzena Smolewska, Tomasz Grzegorz Buczkowicz, Anetta Pogrebniak, Artur Kuźmich

Miejscowość: Białystok, Polska

Spis treści

Miejsca poboru próbek	3
Dlaczego wybraliśmy te miejsca? Nasze oczekiwania	4
Sprzęt i odczynniki, Metodyka	5
Wykonanie oznaczenia	6
Charakterystyka oznaczanych mikroorganizmów	7
Wyniki	8
Wnioski	9

Miejsca poboru próbek

WODA:

1. Rzeka Biała w Białymstoku - rzeka płynąca przez dużą aglomerację i znajdująca się przy często odwiedzanych miejscach przed dopłynięciem do rzeki Supraśl
2. Rzeka Biała w Fastach - rzeka Biała po otrzymaniu wody z oczyszczalni ścieków
3. Rzeka Supraśl po zetknięciu z rzeką Białą - materiał pobrany w miejscowości Fasty po połączeniu się dwóch rzek
4. Rzeka Supraśl przed wpłynięciem do Białegostoku - rzeka płynąca przez niewielkie miejscowości
5. Rzeka Narew przed Łapami - rzeka płynąca przez ponad 100km bez stykania się z żadnymi dużymi miastami

GLEBA:

1. Leśna ziemia - pobrana z lasu na obrzeżach miasta
2. Osad denny - z rzeki Biebrzy na terenie Biebrzańskiego Parku Narodowego
3. Pole uprawne - oddalone od Białegostoku o około 60 kilometrów
4. Osad denny - z dna w miejscu wypływu Rzeki Białej do Rzeki Supraśl
5. Leśna ziemia - pobrana z lasu Zwierzynieckiego w centrum miasta
6. Ulica główna w Białymstoku - Tunel Fieldorfa Nila

Dlaczego wybraliśmy akurat te miejsca?

Wybrane miejsca pozwolą nam porównać stan rzek przepływających przez duże aglomeracje z tymi, przepływającymi tylko przez małe miasta i wsie. Będziemy mogli też zauważyć zmiany w florze bakteryjnej rzeki przed i po zetknięciu się z oczyszczalnią ścieków. Zbadamy ilość bakterii e.coli w wodzie z miasta jak i z parku narodowego oraz ilość pleśni i grzybów w glebie w pobliżu tych rzek.

Czemu posłużą nam wyniki?

Wyniki posłużą nam aby ocenić nieinwazyjność oczyszczalni ścieków na florę bakteryjną oraz ilość grzybów w wodzie i glebie.

Nasze oczekiwania:

Spodziewamy się, iż woda z rzeki Białej płynącej przez miasto będzie zawierała więcej mikroorganizmów, niż ta z rzeki Narew biegnącej przez kilkadziesiąt kilometrów bez kontaktu z większymi miejscowościami. Największej liczby bakterii, drożdży i pleśni oczekujemy od wody z rzeki Białej w miejscowości Fasty - po otrzymaniu wody z oczyszczalni ścieków.

Oczekujemy największej liczby mikroorganizmów z 3 próbek gleby - gleby z okolicy rzeki w Fastach, za miejską oczyszczalnią ścieków. Próbką gleby z sadów Antoniukowskich powinna wykazać pojedyncze kolonie bakterii i grzybów. Najmniejszej liczby zanieczyszczeń biologicznych gleby spodziewamy się po próbkach z ogródków w Łapach i przed oczyszczalnią.

1. Sprzęt i odczynniki

- szalki petriego z gotowym podłożem mikrobiologicznym do oznaczania ogólnej liczby mikroorganizmów, ogólnej liczby drożdży i pleśni oraz bakterii z grupy coli
- probówki z aluminiową pokrywką
- kolby stożkowe 100 ml
- pipety automatyczne
- sterylne końcówki do pipet
- autoklaw
- mieszadło magnetyczne
- ciepłarka
- 0,8% roztwór NaCl (sól fizjologiczna)

2. Metodyka

Aby przeprowadzić zamierzone badania, zastosujemy ekstrakcję próbek gleby solą fizjologiczną (0,8% NaCl). W uzyskanym ekstrakcie oszacujemy ogólną liczbę bakterii oraz populację drożdży i pleśni. W wodzie natomiast dodatkowo oznaczymy zawartość bakterii z grupy coli. Do tego celu wykorzystamy szalki Petriego z suchym podłożem mikrobiologicznym. Bakterie z grupy coli są jednym z indykatorów zanieczyszczenia wody, nazywanych potocznie bakteriami kałowymi. A jeden ze szczepów - *Escherichia coli* - jest odpowiedzialny za najczęstsze zanieczyszczenie wody.

3. Wykonanie oznaczenia

3.1. Woda

Na szalki petriego wprowadzono po 1 ml wody i inkubowano w cieplarni przez:

- 48h w temp 30°C dla ogólnej liczby mikroorganizmów
- 5 dni w temp 30°C dla ogólnej liczby drożdży i pleśni
- 24h w temp 37°C dla bakterii z grupy coli

W 2 próbkach wyrosnięte kolonie mikroorganizmów były tak liczne, że niemożliwe okazało się ich zliczenie. Konieczne było wykonanie posiewów ponownie z próbek rozcieńczonych. W tym celu przygotowano próbki do których wprowadzono po 9 ml roztworu 0,8% NaCl. Probówki z zawartością wyjałowiono w autoklawie. Do przygotowanych probówek wprowadzono po 1 ml badanej wody i metodą kolejnych rozcieńczeń uzyskano stężenie równe 10^{-3} . Tak przygotowane próbki posiewano na szalki petriego i inkubowano w warunkach opisanych powyżej. Zliczanie kolonii itd.

3.2. Gleba

Do kolb stożkowych o poj. 100ml wprowadzono 45ml 0.8% roztworu NaCl, zakryto folią aluminiową i sterylizowano w autoklawie. Do tak przygotowanych kolb dodano po 5g każdej z badanych gleb i ekstrahowano na mieszadle magnetycznym przez 20 minut. W przypadku ogólnej liczby pleśni i grzybów oraz bakterii z grupy coli posiewy wykonano bezpośrednio z otrzymanego ekstraktu, poprzez wprowadzenie 1ml bezpośrednio na szalki. W przypadku ogólnej liczby mikroorganizmów konieczne okazało się wykonanie rozcieńczenia do poziomu 10^{-3} w sposób analogiczny do próbek wody. Inkubowano w warunkach jak opisano powyżej.

4. Charakterystyka oznaczanych mikroorganizmów

- **Ogólna liczba mikroorganizmów** - jest to wskaźnik ogólnej liczby bakterii hodowanych. Są to organizmy psychrofilne, giną poniżej temperatury 0°C i powyżej 30°C, najlepiej rozwijają się w temperaturze 15°C. Uważa się, że nie istnieje niebezpieczeństwo choroby, jeśli ilość tych bakterii nie przekracza **100 w 1 ml wody**.
- **Drożdże i pleśnie** - Drożdże są to mikroskopowe grzyby, które powszechnie występują w przyrodzie i mogą powodować zanieczyszczenia mikrobiologiczne we wszystkich gałęziach przemysłu spożywczego. Mogą być wprowadzone z surowcem, jak również mogą stanowić zanieczyszczenie wtórne pochodzące od personelu lub powietrza. Drożdże są również największą grupą komercyjnie wykorzystywaną przez człowieka. Pleśnie to grzyby strzępkowe, które powodują aż 8% chorób u roślin. Pleśnie są szkodliwą mikroflorą z uwagi na tworzenie się metabolitów wtórnych mykotoksyn.
- **Bakterie z grupy coli** - W Polsce są przyjęte jako wskaźnik zanieczyszczenia wód pod względem sanitarnym. Same bakterie grupy coli w większości nie są szkodliwe dla człowieka. Ich obecność świadczy, jednak o obecności innych bakterii chorobotwórczych. Jeśli okaże się, iż w wodzie są bakterii typu coli - wody nie można pić bez przegotowania. Niebezpieczeństwo polega na tym, iż pojawienie się tej bakterii oznacza możliwość obecności w wodzie także groźnych dla człowieka mikroorganizmów chorobotwórczych. Jednak należy podkreślić, że bakteria z grupy coli może być bakterią chorobotwórczą w pewnych warunkach. Wywołuje, bowiem zakażenie układu moczowego, jak i zapalenie opon mózgowych u noworodków. Według rozporządzenia bakterie grupy coli **nie mogą być obecne w 100 ml badanej wody**.

5. Wyniki badań:

WODA:

Porównując zawartość grzybów i drożdży w wodach z rzek największą ilością odznaczyła się woda z rzeki Supraśl. Woda z rzeki Narwi również zawierała jedną większą kolonię, w wodzie z rzeki Białej połączonej z rzeką Supraśl i rzece Białej za oczyszczalnią zauważalne były pojedyncze drożdże i grzyby. W wodzie z rzeki Białej w mieście zaobserwowaliśmy jednego osobnika. Powyższe dane pochodzą z badań na nierozcieńczonej próbce. Przy większych rozcieńczeniach nie ukazały się żadne drożdże czy grzyby.

Bakterie z grupy coli obecne były tylko w dwóch próbkach. Woda z rzeki Białej w centrum miasta zawierała jedną bakterię, za to woda z Rzeki Supraśl przed miastem zawierała dużą kolonię liczącą około 30 osobników.

Największa ogólna liczba mikroorganizmów została wykryta w próbce z Narwi. Śladową zawartość wykazała też próbka z rzeki Supraśl. W pozostałych próbkach nie wykryto mikroorganizmów.

GLEBA:

Porównując zawartość grzybów i drożdży w glebie największą ilością odznaczyła się gleba leśna. Dużą zawartość wykazała też gleba z tunelu im. Gen. Augusta Fieldorfa "Nila". W innych próbkach nie wykazano prawie żadnych drożdży i grzybów. Powyższe dane pochodzą z badań na nierozcieńczonej próbce. Przy większych rozcieńczeniach nie ukazały się żadne drożdże czy grzyby.

Bakterie z grupy coli nie zostały wykryte w żadnej z próbek gleby.

Największa ogólna liczba mikroorganizmów w rozcieńczeniu 10^{-3} została wykryta w próbce z tunelu Fieldorfa Nila. Dużą zawartość wykazały też próbki gleby zebrane na polu uprawnym i w lesie zwierzynieckim. W próbce pobranej przyłączeniu rzek białej i supraśli wykryto około 30 kolonii. Pozostałe próbki oscylowały około 10 kolonii.

6. Wnioski:

Najmniej mikroorganizmów zawierały wody z rzeki Białej w centrum miasta oraz Białej, która płynie za oczyszczalnią. Te wody przechodzą kontrole sanitarne i nie są zanieczyszczane żadnymi niebezpiecznymi substancjami. Rzeka Biała połączona z rzeką Supraśl i rzeka Narew zawierały więcej zanieczyszczeń, ponieważ są to rzeki płynące przez bagna i małe wsie. Najwięcej mikroorganizmów zauważalne było w rzece Supraśl, płynącej przez choć niewielkie, to gęsto zaludnione miejscowości pod miastem. Bakterie, drożdże i grzyby najlepiej rozwijają się tam, gdzie do rzek mają dostęp ludzie oraz nie są one poddawane szczegółowym badaniom, a w razie wykrycia nieprawidłowości - także oczyszczaniu.