

УНИВЕРЗИТЕТ "КИРИЛ И МЕТОДИЈ"  
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ  
ИНСТИТУТ ЗА БИОЛОГИЈА  
СКОПЈЕ

**III ЈУГОСЛОВЕНСКИ СИМПОЗИУМ  
ЗА МИКРОБНА ЕКОЛОГИЈА**

**ЗБОРНИК НА ТРУДОВИ**

**THIRD YUGOSLAVIAN SYMPOSIUM ON MICROBIAL ECOLOGY  
The Book of Scientific Papers**

**16.-19.10.1991  
Дојран, Хотел "МЛАЗ"**



**Дојран 1991.**

*Покровител на Симпозиумот*

**ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ  
ИНСТИТУТ ЗА БИОЛОГИЈА**

*Потпокровител на Симпозиумот*

**СОЈУЗ НА ДРУШТВАТА НА МИКРОБИОЛОЗИТЕ  
НА ЈУГОСЛАВИЈА**

## КОРЕЛАЦИЈА ПОМЕЃУ ВКУПНИТЕ ХЕТЕРОТРОФНИ И КОЛИФОРМНИ БАКТЕРИИ ВО ВОДИТЕ НА РЕКАТА БРЕГАЛНИЦА

Лилјана Колева<sup>1</sup> и Џоко Кунгуловски<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ул. " Коста Бозов " бр. 2, Струмица

<sup>2</sup>Институт за биологија, Природно-математички факултет, Скопје

Целта на оваа работа беше да се утврди корелацијата помеѓу вкупните хетеротрофни и колиформни бактерии во водите на реката Брегалница.

Во текот на 1988/89 година беа извршени бактериолошки испитувања на водите од реката Брегалница и тоа од изворот па се до самиот влив во Вардар. Пробите беа земани од слободната вода на девет постојани точки.

Хетеротрофните бактерии беа одредувани со користење на методата на мембранска филтрација на МПА, а колиформните бактерии беа одредувани со користење на истата метода на Endo agar.

Во пролетната сезона најголема застапеност на хетеротрофните бактерии се забележува на мерните точки 5 ( 370 кол./мл ) и 9 (341 кол./мл), што е во директна врска со оптоварувањето на водата со фекални води од свињарската фарма во Делчево и градските комунални води од градот Штип.

Во оваа сезона јасно е изразена корелацијата помеѓу хетеротрофните и колиформните бактерии на сите испитувани точки.

Корелацијата помеѓу двете испитувани групи на бактерии скоро низ целиот тек од реката забележана е и во летната сезона.

Истите законитости се повторуваат и во есенската и зимската сезона.

Од резултатите добиени во текот на овие истражувања може да се заклучи дека вкупниот број на колиформните бактерии го следи квалитативниот и квантитативниот состав на хетеротрофната бактериска популација во сите четири сезони од годината. Оваа законитост е карактеристична за целиот тек на реката.

# KORELATION BETWEEN TOTAL HETTEROTROPHIC AND COLIFORM BACTERIAS IN THE WATER ON THE RIVER BREGALNICA

Liljana Koleva and Gjoko Kungulovski  
Ss. Cyril and Methodius University in Skopje, Institute of Biology,  
Faculty of Natural Science and Mathematics, - Skopje, Rep. of. Macedonia

III Yugoslavian Symposium on Microbial Ecology, the Book of Scientific Papers  
16-19.10. 1991, Dojran, R of Macedonia,

## Abstract

The aim of this examination was to establish the correlation between total heterotrophic bacteria in the water on the river Bregalnica.

During the 1988/89 bacteriological examinations, on the water in the river Bregalnica from the springwater to the empties into the river Vardar, were done. The tests were taken from the here water on the nine steady points: 1. Spring water, 2. village Ablanica, 3. village Mitrasinci, 4. village Trbotiviste, 5. village Dramce, 6. after the Kalimanci dam, 7 village Zrnovci, 8. village Dolni Balvan and 9. Stip.

Heterotrophical bacteria were growth wit uses the method of membrane filtration on MPA and the coliform bacteri were growth with uses on the same method on the Endo agar.

## 1. ВОВЕД

Водата е еден од основните елементи за постоењето на животот на земјата. За нејзиното значење не треба многу да се зборува. Самиот факт дека без вода нема живот – кажува сè.

Со техничко - технолошкиот и индустрискиот прогрес природните води почнуваат неконтролирано да се загадуваат. Денес, се почесто сме сведоци за неконтролираното загадување на водените еко системи со индустриски отпаден материјал, со што се доведува во прашање егзистенцијата на водените популации. Таа отиде толку далеку што некои водени системи се донесени на работ на еколошка катастрофа.

Водата може да биде контаминирана и од различни цревни микроорганизми. Тие води се фекално загадени а може да содржат и патогени видови. Според тоа такви води може да бидат алка во пренесувањето на разни болести како што се колера, стомачен тифус, паратифус, бацилна дезинтерија и други слични манифестации. Овие инфекции може да поминат во рамките на епидемии кога е погодено општото водоснабдување а ако човечкиот фактор на контрола и пречистување на вакви води е затаен.

Човекот, според тоа, се јавува не само како основен фактор во загадувањето на водата, туку и како единствен субјект во контролата на степенот на загадувањето и нејзиното пречистување. Затоа неминовна е систематската анализа на санитарниот квалитет на сите природни води (истечни и неистечни) како и на технолошката и пиечката вода.

Како и пиечките така и површинските води подлежат на одредени критериуми за хигиенски квалитети. Исправноста за пиечка вода е законски регулирана и тоа треба максимално да се почитува.

Бактериолошкиот преглед на природните површински води има три цели:

1. Определување на степенот на загаденоста
2. Утврдување на ефикасноста и брзината на самопрочистувањето на загадената површинска вода и
3. Откривање на евентуален продор на отпадни води, фекално загадени во водоносните системи.

### 1.1 Нативни бактерии во природните води

Бактериите чие природно место на живеење е водата не се добро познати во целост, бидејќи многу од нив тешко растат во лабораториски средини. Како и да е, не е во прашање нормалната бактериска флора, туку нејзиниот карактер. Бактериските типови кои ја создаваат оваа природна популација може кратко да се разделат:

1. Бактерии од повисок степен, најчесто капсуларни форми, карактеристични *Chlamido* бактерии и содржат S, F и други форми.
2. *Saulobacteria* група на „основни“ бактерии настануваат во езера и други води и прицврстени се за некои мртви објекти во водата.

3. Спирални форми кои се најчесто во голем број застапени во водата. Некои од нив може да бидат многу големи 20-30 микрони во должина, во споредба со паразитските спирали.
4. Вариетети на бацили вклучувајќи ги:
  - а). Пигментни форми како што е *Serratia marcescens*, *Chlamydo bacter violaceum* и *Bacteria aurescens*.
  - б). Различни непигментни форми како што се:
    - флуоресцентни бактерии,
    - некои од сулфурните бактерии,
    - термофили и
    - аеробни спорозоносни бацили од некои таксономски категории.
5. Коки
  - а). Пигментирани обично жолто *Sarcina Lutea*
  - б). Непигментирани *Micrococcus aquatilis*, *Micrococcus candidans* и др.
6. Азотофиксаторски бактерии, особено *Azotobacter aquatilis*
7. Нитрификациски бактерии заедно и *Nitrosomonas* и *Nitrobacteria*.

Овие водени бактерии се најдени во свежа вода во мочуриштата, потоци и езера. Бактериската популација на морската вода не е проучувана толку на широко, но во морската содржина се појавуваат слични бактерии, вклучувајќи ги азотофиксаторските форми, флуоресцентните бактерии, различни пигментни форми и други слични.

Водените бактерии носат исти односи на постојано и повратно преобразување на органската материја како што ги прават истите процеси во почвата и воздухот, затоа тие се интегрален дел од акватичниот живот.

Само некои од водените бактерии мажат да се култивираат на лабораториска хранлива подлога. Ниедна хранлива средина не е задоволувачка за нив (пр. нитрификациските бактерии не можат да растат на органска материја).

### 1.2 Бактериолошка анализа на водата

Бактериите чие присуство во водата е последица од фекално загадување не се јавуваат во незагадени води и тие се доволно различни од вродените водени бактерии и може брзо и лесно да се разликуваат. Од овие бактерии колиформните бацили се застапени во најголема бројност, додека *Streptococcus fecalis* и *Clostridium perfringens* иако постојани не се толку бројни. Според тоа јасно е дека секој од овие микроорганизми може да се користи како индикатор за загадувањето. Во Европа колиформните бацили исклучиво се користат како мерило за загадувањето исто како и *Streptococcus fecalis* и *Clostridium perfringens*. Стрептококите понекогаш тешко се диференцираат и изумираат побрзо за разлика од колиформните бацили. *Clostridium perfringens* е непогоден а неговите спори остануваат способни подолго време во споредба со колиформните бацили. Затоа *Clostridium perfringens* не допушта разликување на свежо и старо фекално загадување.

Бактериолошкото загадување на водата за присуството на колиформни бацили се заснова на фактот дека овие микроорганизми ја ферментираат лактозата а стандардниот процес за испитување се состои од три дела: претходен тест; потврден тест и завршен тест.

### 1.3 Микробни индикатори

Очигледно е дека задоволувачкиот индикатор за загадувањето мора да опстанува што е можно подолго, особено подолго од патогените микроорганизми кои можат да им се придружуваат. Микроорганизмите како колиформните бацили, ентерококите и *Clostridium perfringens* сите опстануваат подолго отколку патогените ентерични бацили како што е тифусниот бацил и под некои околности во прва можност покажуваат краткотрајно множење.

Колиформната група е разнородна во границите на поголема група на грам негативни ентерични бактерии. Оние кои ја ферментираат лактозата се микроорганизми најдени во претходниот тест на фекалното загадување вклучувајќи ги коли и аерогенес типовите со преодни форми меѓу нив. Тие се сместени во различни родови т.е. *Escherichia coli* и *Aerobacter derogenes* или во родот *Bacterium* во зависност од номенклатурата. Освен според номенклатурата, диференцијацијата на овие колиформни видови една од друга се изведува и според био-хемиските реакции кои се стандардизираат за оваа цел. Како и да е, овие разлики имаат некое значење во врска со санитарниот квалитет на водата. Докажано е дека колиформните видови имаат примарно значење за фекалното загадување додека аерогенес видовите може да се најдат слободни во

природата. Аерогенес типовите често се наоѓаат и во цревата и ретко отсуствуваат од можното фекално загадување на почвата и сомнително е дека диференцијацијата на овие два типа има значење во други прифатливи услови.

Од горе кажаното, произлегува дека  $\alpha$  – хемолитичките стрептококи од фекално потекло, стрептококите и *Clostridium perfringens* се различно фекално потекло. Ентерококите егзистираат подолго од патогените ентерични бактерии, но не така долго како колиформните и тие најчесто се наоѓаат во значајно помал број од колиоформните. Од најголемо значење за санитарниот квалитет на водата се колиформните видови посебно *Escherichia coli* и *Clostridium perfringens*, индикатори на свежо и старо фекално загадување.

## 2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЕН ДЕЛ

Цел на оваа дипломска работа е испитувањето на сезонската застапеност и бројот на: хетеротрофни (сапрофитни) бактерии на 20°C психрофилии, хетеротрофни (сапрофитни) бактерии на 37°C мезофилни во 1 ml испитувана вода и фекални индикатори од родовите *Escherichia coli* и *Clostridium perfringens*.

Како предмет на проучување се земени 9 стални точки од реката Брегалница: 1. Извор, 2. село Абланица, 3. село Митрашинци, 4. село Триботивиште, 5. село Драмче, 6. по брана Калиманци, 7. село Зрновци, 8. село Долни Балван и 9. во Штип.

Пробите за анализа земени се:

- 01 и 02 Јуни 1988 год. (пролетна проба)
- 30 и 31 Август 1988 год. (летна проба)
- 14 и 15 Октомври 1988 год. (есенска проба)
- 01 и 02 Февруари 1989 год. (зимска проба)

### 2.1 Земање на проби за анализа

Пробите за микробиолошка анализа земени се од слободната вода на испитуваните точки. За оваа цел се користат стерилни ерленмаери од 500 ml со шлифуван затварач. Ако во водата се сомнева за присуство на хлор, се додава по 0,1 ml на 3% раствор на  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  на секој 170 ml вода. Пред самото земање на пробата грлото на ерленмаерот се фламбуира и истиот се потопува во водата 20-30 cm под површината а спрема индикаторите за природата на загадувањето (особено фекално), се зема проба и при дното, на исто растојание (20-30 cm). Ерленмаерите се полнат 2/3 од нејзиниот волумен (не смее да се земе проба од самата површина на водата ниту ерленмаерите да го допираат дното).

### 2.2 Пренесување на примероците на вода

Резултатите од бактериолошкиот преглед на водата зависат од брзината на доставувањето на примероците. Бројот на колиформните бацили (мезофили) се зголемува кога при пренесувањето на примероците температурата е поголема од 20°C, додека бројот на психрофилните бактерии (сапрофити) останува непроменет или се намалува. Поради тоа бактериолошкиот преглед мора да се изведе што е можно порано по земањето на примероците и при температура на водата која оневозможува развој на бактериите (4-6°C). За да овој услов биде исполнет треба примероците на водата да се пренесуваат во специјални сандачиња кои се направени од материјал кој е слаб проводник на топлина, во кој помеѓу ерленмаерите се става мраз и струготини. Што се однесува до времето на транспортот не би требало да е повеќе од 6-8 часа, при поголеми надворешни температури ако водата не е вештачки разладена. Доколку водата е разладена од 4-6°C времето на транспортот може да се продолжи до 24 часа.

### 2.3 Хранливи подлоги

#### - Мезопептонски агар (МРА)

Бројот на хетротрофните психрофилни (на 20°C) и мезофилните (на 37°C) бактерии одгледуван е на стандардна подлога од месно-пептонски агар (МРА) со следниот состав:

Пептон .....	10 g
Месни екстракт .....	3 g
NaCl .....	5 g
Агар .....	5 g
Dest. H <sub>2</sub> O .....	1000 ml

Вака припремената подлога се стерилизира во автоклав 15 мин. на температура од 120°C и притисок 1,2 атмосфери. Потоа се лади до температура до 45°C и се разлива по 10 ml петриevi плочи кои се чуваат во фриждер.

- **Брилијант зелено – лактозно – жолчни бујон**

Најверојатниот број на колиформни бактерии (NBK) одредуван е по методата на гранични разредувања во епрувети со Durham-ови цевчиња на подлога од брилијант зелено – лактозно – жолчни бујон со состав:

Пептон 4 .....	10 g
Квасни екстракт .....	3 g
Лактоза .....	10 g
Фенол црвено .....	20 g
NaCl .....	5 g
Брилијант зелено .....	0,0125 g

Од оваа подлога се земаат по 10 ml и се става во епруветите до Durham-ови цевчиња, а потоа се стерилизира во автоклав 15 мин. на температура од 120°C и притисок 1,2 атмосфери.

- **Ендо агар**

Фекалните колиформни (*Escherichia coli*) бактерии се одредуваат на ендо агар (со мембрански филтри и соодветни разредувања) со хемиски состав на подлогата:

Пептон .....	10 g
лактоза .....	10 g
20% p-p Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> .....	10 ml
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	4 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	1 g
Агар .....	20 g
Заситен p-p на базичен фуксин .....	6 ml
Dest. H <sub>2</sub> O .....	1000 ml

Подлогата се носи на стерилизација во автоклав 15 мин. на температура од 120°C и притисок 1,2 атмосфери, а по изладувањето се разлива во петриevi плочи.

Крајната детерминација на *Escherichia coli* вршена е со помош на биохемиска тетрада IMVIC (индол, метил род, Voges-Proskauer и цитрат).

Како подлога за докажување на индолот користен е бујон со следниот :

Пептон .....	20 g
NaCl .....	5 g
Dest. H <sub>2</sub> O .....	1000 ml

За докажување на метил род реакцијата е користена следната подлога:

Пртеаза пептон .....	5 g
Калиум фосфат .....	5 g
Гликоза .....	5 g
Dest. H <sub>2</sub> O .....	1000 ml

За Voges-Proskauer се користи следнава подлога:

Пептон .....	5 g
Гликоза .....	5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	5 g
Dest. H <sub>2</sub> O .....	1000 ml

Способноста за искористување на цитратот како единствен извор на јагленородот, испитувана е со SIMSO–ов агар во состав:

Na Cl .....	5 g
(NH <sub>4</sub> )H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	1 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O .....	0,2 g
Na цитрат .....	5 g

p-p на бром тимол плаво .....40 ml  
Агар ..... 20 g

#### - **Wilson-Blair подлога**

Сулфитредуцирачките бактерии (*Clostridium perfringens*) индикатори на фекално загадување, испитувани се и броени во длабок агар во Wilson-Blair подлога:

МРА ..... 1000 ml  
20 % p-p на Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ..... 100 ml  
20 % p-p на гликоза ..... 50 ml  
8 % p-p на FeSO<sub>4</sub> ..... 10 ml

Подлогата се стерилизира во автоклав 15 мин. на температура од 120°C и притисок 1,2 атмосфери.

#### **2.4 Техники за бактериолошки преглед на водата**

Со бактериолошкиот преглед на водата треба да се одреди присуство или отсуство на колиформни бактерии во примероците. Потоа се одредува нивниот најверојатен број пресметан во 1000 ml вода со помош на специјални рачунски таблица на веројатност, без оглед дали тоа се пречистени или природни води.

Во природни води при наоѓањето на колиформни бактерии се наметнува точно одредување на *Escherichia coli* и дополнително откривање на *Clostridium perfringens*. Кај оваа категорија на води задолжително е одредување на вкупниот број на сите живи бактерии содржани во 1 ml запремина.

Лабораториската анализа на замените проби од 9-те точки на реката Брегалница, е вршена после 12-24 часа од земањето на водата за анализа.

#### **2.5 Претходен тест**

Во оваа фаза се прикажува присуство или отсуство на поедини колиформни бактерии во извесни запремини засеани води, кои се размножиле со култивирање до 48 часа при температура од 35-37°C. Бројот и износот на овие запремини вода за засејување е во зависност од начинот на третирање и потеклото на испитуваната вода, т.е. во зависност од тоа колкаво загадување очекуваме. Според тоа постапката на испитување т.е. изборот на запремини зависи од загадувањето.

За добивање на соодветните запремини на вода, вршме разредување со стерилен физиолошки раствор или стерилна дестилирана вода. За недоволно заштитени води, изложени на поголемо бактериолошко загадување потребни се следните разредувања: 1:10; 1:100; 1:1000 и дури евентуално 1:10000 за страшно загадени води. Овие разредувања одговараат на 1,1; 0,01; 0,001; (0,0001) ml од испитуваната вода. Разредувањето се врши со цел да се намали бројот на суспендираните бактерии во единица запремина на загадените води.

На претходно припремени 7 епрувети со по едно Дурхамово цевче и подлога од брилијант-лактозо-зелено, ја засејуваме испитуваната проба.

1. При засејување на помалку загадена вода се зема:

а). Шест запремини 1 ml вода во првите пет епрувети со Дурхамови цевчиња;

б). Една запремина од 1 ml вода разредена 1:10 т.е. 0,1 ml од испитуваната проба во шестата епрувета;

в). Една запремина од 1 ml вода разредена 1:100 т.е. 0,01 ml проба во седмата епрувета.

2. Ако се очекува поголем степен на бактериско загадување, се засејува како (а; б; в) исти услови, но десетоструко помалку вода разредена со стерилен физиолошки раствор, т.е. пет пати по 0,1 ml еднаш по 0,01 ml и една по 0,001 ml речна вода.

3. Во колиметријата на јако загадени води се засејува уште десет пати помала количина вода од претходната и секогаш пет пати по 0,01 ml еднаш по 0,001 ml и еднаш по 0,0001 ml

Разредената вода се засејува во количина од 1 ml а најпрвин се почнува до најголемото разредување, т.е. најмалата количина вода, а потоа по ред по големина. За испитувањата на реката Брегалница е работено како под точка 2 (5 x 0,1; 1 x 0,01; 1 x 0,001).

По засејувањето епруветите се оставаат во термостат за инкубација на 37°C. Резултатите се читаат после 24 часа а најмногу 48 часа. Читањето се состои во утврдување отсуство или присуство на гас во Дурхамовите цевчиња (кое се одредува визуелно). Се прати и евентуалната промена на бојата (заматување) на подлогата.



1. Ако резултатот е позитивен по 24 часа покажува голема веројатност на присуство на колиформни бактерии, или барем на една колиформна бактерија а може и самата подлога да се заматил.

2. Ако резултатот е сеуште неодреден и по 24 часа, и ако нема промени во подлогата, се продолжува со инкубација за следните 24 часа, и повторно се чита.

3. Резултатот е негативен ако и после 24 часа инкубација не се створил гас ниту има промени во подлогата. Ваков резултат исклучува присуство на колиформни бактерии, но не и присуство на други индикатори на фекалното загадување.

Комбинациите на најверојатните броеви на квалитативното одредување на колиформните бактерии се средени во табели на стандардни методи за бактериолошко испитување на речните и отпадните води. Во случај на засејување на следните разредувања 5 x 0,1 ml; 1 x 0,01ml и 1 x 0,001 ml кое е вршено за испитување на реката Брегалница, важечка е следната табела:

Табела 1 Резултатите дефинитивно се одредуваат со NBK на 1l испитувана речна вода.

Реден број	Број на епрувети со позитивен резултат од претходниот тест (во кој се створил гас)			Најверојатен број колиформни бацили во 1ml испитувана вода
	I Епрувета со 0,1 ml	II Епрувета со 0,01 ml	III Епрувета со 0,001 ml	
1	0	0	1	2.000
2	0	1	0	2.000
3	0	1	1	4.000
4	1	0	0	2.000
5	1	0	1	4.400
6	1	1	0	4.400
7	1	1	1	6.700
8	2	0	0	5.000
9	2	0	1	7.500
10	2	1	0	7.600
11	2	1	1	10.000
12	3	0	0	8.000
13	3	0	1	12.000
14	3	1	0	12.000
15	3	1	1	16.000
16	4	0	0	15.000
17	4	0	1	20.000
18	4	1	0	21.000
19	4	1	1	27.000
20	5	0	0	38.000
21	5	0	1	96.000
22	5	1	0	240.000

## 2.6 Потврден тест

За да се види дали формираните гас е резултат на активноста на колиформните бактерии или некои други (на пр. бацили) се приоѓа кон овој тест. Со еза се зима материјалот од испитуваната вода и се пренесува на ендо агар со методата на исцрпување. Подлогите се инкубираат 24 часа на температура од 37°C. Колониите кои ќе израснат на површината на ендо агарот можат да бидат: **а)** типични т.е. црвени со метален сјај или без сјај; **б)** Атипични кои можат за бидат розе, бели или светло црвено обоени во повеќето случаеви слузави;

Ако се типични најверојатно се работи за *Escherihia* а ако се атипични најверојатно се во прашање родовите *Klebsiella* или *Enterobacter*.

## 2.7 Завршен тест

Овој тест се состои во тоа што преку биохемиска тетрада се детерминираат родовите и видовите на микроорганизмите кои се наоѓаат во испитуваната вода.

### 1. Формирање на индол

Некои микроорганизми со својот специфичен ензимски состав способни се да го разлагаат триптофанот до индол. Бидејќи триптофанот е аминокиселина која има индолов прстен, неговото разложување се смета за специфична реакција.

Постапка: Во засеаната и инкубирана подлога 4 дена на 37°C се додава 1 ml ксилол за да се естрахира индолот. Епруветата добро се промешува и се остава на сталак за да исплива ксилолот на површината. Потоа се додава 1 ml раствор А (парадиметиланинобензалдехид 1 g., 96% алкохол 95 ml., конц. HCL 20 ml). Ако во подлогата е присутен индол на границата меѓу подлогата и ксилолот ќе се формира интензивно црвено обоен прстен. Ако црвентата боја на прстенот е резултат на формираните индол, со додавање на неколку капки од растворот В (заситен воден раствор  $K_2S_2O_8$  – калиум персулфат) бојата се појачува.

### 2. Метил род реакција

Подлогата заедно со метил род 0,1 g; 96% алкохол 250 ml; и дестилирана вода 250 ml се раствараат со засејување. Растворот се филтрира и се разлива по епрувети кои се автоклавираат. Епруветите се засејуваат со испитуваната култура и инкубираат 5 дена на температура од 30 °C.

Обавезно се инкубира и контролната епрувета. После инкубацијата во епруветите се додава неколку капки метиленско црвено. Реакцијата е позитивна ако растворот се се обои црвено, сомнителна - портокалово и негативна - жолто. Позитивна реакција покажува дека концентрацијата на  $H^+$  јоните во растворот е висока, па pH опаднала на 4,5 или помалку.

### 3. Voges – Proskauer реакција

Оваа реакција се користи за докажување на ацетил-метил карбинол кој се формира при метаболизмот на гликозата. Засеаната подлога се инкубира 48 часа на температура од 30°C. Реакцијата се изведува на тој начин што во епруветата се додава 3 ml раствор А (алфа нафтол 5 g, 96% алкохол - 100 ml), и 1 ml раствор В (40 % раствор KOH). (на 1 ml култура се додава 0,6 ml p-p А и 0,2 ml p-p В).

Епруветата добро се промешува и се остава на сталак да стои до појавата на црвена боја која е знак за позитивна реакција. Обично епруветата стои 2-4 часа. Најчесто црвената боја се јавува по 5 мин. За време на овој период, со помош на реагенсот се врши оксидација на ацетил-метил карбинолот во диацетил-метил карбинол кој дава црвена боја.

### 4. Цитратна реакција

Способноста за искористување на цитратот како единствен извор на јагленород, испитувана е на Симонсов цитратен агар. Инкубацијата се врши на 24-48 часа на температура 37°C. При позитивна реакција подлогата се обојува плаво. *Escherichia coli* спрема IMVIC се однесува (++++).

Бројот на *Escherichia coli* се одредува на 1 ml испитувана вода. Одредувањето може да се изврши на два начина:

1. Директно внесување на 1 ml
2. со методот на мембрански филтер

Принципот на методата се состои во бактериолошко филтрирање на водата низ еден филтер со посебен физичко-хемиски состав (реверзибилни хидрогени естри на целулозата). Филтерот делува како семипермеабилна мембрана задржувајќи ги сите микроорганизми а пропуштајќи ја водата бактериолошки чиста.

По филтрирањето мембранскиот филтер се пренесува на ендо агарот.

По инкубацијата од 24 -48 часа на 44°C (тест) се врши броење на израснатите типични колонии со црвена боја и метален сјај.

### 2.8 Докажување и броење на *Clostridium perfringens* во водата

Методот за докажување *Clostridium perfringens* во водата се базира на неговата особина да го редуцира безводниот  $Na_2SO_4$  во  $Na_2S$ . Оваа последно соединение во присуство на солите Fe создава FeS (железен сулфид) кој ги бои во црвено колониите од *Clostridium perfringens*.

Најдобра подлога за докажување на *Clostridium perfringens* во вода е Wilson-Blair -овата подлога.

Во 3 епрувети ставаме по 1 ml од испитуваната проба со различно разредување. Во првата епрувета се става 1 ml неразредена проба, во втората 1 ml со разредување од 1 : 10 што одговара на 0,1 ml проба а во третата 1 ml со разредување од 1 : 100 што одговара на 0,01 ml проба.

За да се уништат другите аспорогени бактерии како и нивните живи форми на *Clostridium perfringens*, епруветите се загреваат во водена бања на температура од 80°C, 25 минути. Оваа температура не ги уништува спорите на *Clostridium perfringens*.

Откако ќе се изладат епруветите се полната со подлогата одржувана на температура од 50°C, и се инкубираат 24 часа или 48 часа на температура од 37°C. За време на инкубацијата спорите се развиваат и создаваат црни правилно округли колонии. Колониите се бројат во сите епрувети во кои се створиле, и тоа штом се забележат, бидејќи подоцна доаѓа до распрскување на подлогата, а потоа и до создавање на гас што го оневозможува броењето. При броењето ситните сиви колонии не се земаат во обзир бидејќи припаѓаат на други бактериски видови, кои се без хигиенско значење. Од изброените колонии во сите три епрувети, се бара средна вредност, и резултатот се сведува на број на *Clostridium perfringens* милиметар.

### 2.9 Одредување на вкупниот број на бактерии, Одредување на бројот на хетеротрофните бактерии (психрофилни и мезофилни)

Бројот на хетеротрофните (психрофилни и мезофилни) бактерии се одредува на стандардна подлога од мезопептонски агар на припремени петриевки со хранлива подлога од МРА се засејува по 1 ml од пробата во првите две, а во другите две по 1ml со разредување 1 : 10. Потоа со стаклено стапче материјалот рамномерно се распоредува по површината на подлогата.

Двете петриевки (едната со проба а другата со 1 : 10 разредување) се инкубираат на 37°C 24 часа за мезофилните бактерии, а другите две се инкубираат на 20°C 48 часа за психрофилните бактерии. По инкубациониот период се врши броење на бактериите, при што земено е да секоја развиена колонија настанала од една единствена бактерија.

Од изброените бактерии во двете петриевки се бара средна вредност и резултатот се сведува на број бактерии во 1 ml.

## 3. РЕЗУЛТАТИ

Табела 2. Бројност и застапеност на поедини групи и бактерии во сезона **Пролет**

точки	NBK	Escherichia coli	Chostridium perfringens	Хетеротрофни 20°C (ml)	Хетеротрофни 37°C (ml)
1	6.700	∅	∅	7	3
2	7.500	∅	∅	56	36
3	240.000	∅	9	58	43
4	240.000	290	6	63	46
5	240.000	68	5	420	370
6	96.000	43	3	79	63
7	21.000	∅	∅	103	81
8	240.000	112	9	90	59
9	240.000	230	64	430	341

Табела 3. Бројност и застапеност на поедини групи и бактерии во сезона **Лето**

точки	NBK	Escherichia coli	Chostridium perfringens	Хетеротрофни 20°C (ml)	Хетеротрофни 37°C (ml)
1	∅	∅	∅	210	111
2	∅	1	∅	290	45
3	∅	1	3	30	30
4	2.200	∅	∅	130	42
5	2.200	∅	∅	38	36
6	∅	∅	∅	73	63
7	24.000	∅	∅	760	430
8	4.400	11	∅	47	39
9	240.000	38	∅	2.112	1.200

Табела 4. Бројност и застапеност на поедини групи и бактерии во сезона **Есен**

точки	NBK	<i>Escherichia coli</i>	<i>Chostridium perfringens</i>	Хетеротрофни 20°C (ml)	Хетеротрофни 37°C (ml)
1	2.200	18	∅	330	320
2	∅	9	∅	250	270
3	500	1	200	800	570
4	8.800	24	∅	730	620
5	5.000	∅	300	280	210
6	2.200	3	∅	640	420
7	8.800	3	∅	390	430
8	38.000	12	300	1.200	480
9	38.000	12	800	4.800	800

Табела 5. Бројност и застапеност на поедини групи и бактерии во сезона **Зима**

точки	NBK	<i>Escherichia coli</i>	<i>Chostridium perfringens</i>	Хетеротрофни 20°C (ml)	Хетеротрофни 37°C (ml)
1	∅	∅	∅	260	35
2	∅	∅	∅	300	6
3	10.000	2	4	3.800	720
4	2.200	∅	∅	800	44
5	2.200		10	190	55
6	∅	∅	∅	283	65
7	38.000	1	2	200	70
8	240.000	26	50	4.600	2.400
9	240.000	105	7	11.050	300

#### 4. ДИСКУСИЈА

##### Точка 1 – Извор

Како сите изворски води, така и изворот на реката Брегалница покажува минимален степен на пурификација. Тоа е релативно чиста вода и добро аерирана. Освен во периодот есен, кога се изброени 18 бактерии на милиметар од родот *Escherichia coli* во другите годишни сезони не се застапени претставниците од родот *Escherichia coli*, ниту пак од родот *Clostridium perfringens*. Што значи скоро и отсуствува фекалното загадување. Вкупниот број на хетеротрофни бактерии(сапрофити) покажува да во пролет оваа вода сапробиолошки е на граница меѓу олигосапробиобна и  $\alpha$  – мезосапробна, а во лето, есен и зима на граница меѓу  $\beta$  – мезосапробна. Присуството на бактериите во изворската вода е исклучиво од нивно попаѓање од воздухот и почвата. Оваа вода може да се користи за пиење, а присуството на *Escherichia coli* во есенскиот период е инцидентно.

##### Точка 2 – с. Абланица

Водата од оваа точка покажува минимално загадување. *Clostridium perfringens* отсуствува во сите сезони, а *Escherichia coli* е забележана во летната проба и тоа само една бактерија на милилитар и во есенската проба и тоа 9 бактерии на милилитар. И овде фекалното загадување е многу на ниско ниво. Сапробиолошки оваа вода се движи од  $\alpha$  – мезосапробна до  $\beta$  – мезосапробна.

##### Точка 3 – с. Митрашинци

Во оваа точка се забележува осетно зголемување на сите испитувани параметри на загадувањето. Додека кај претходните две точки фекалното загадување отсуствува, во оваа точка присутни се родот *Escherichia coli* и *Clostridium perfringens* во сите сезони. Забележано е рапидно зголемување на NBK и на вкупниот број на бактерии како психрофилни така и мезофилни. Оваа должи на загадувањето од фармите за свињи во Берово. Затоа се присутни индикаторите на фекалното загадување, а и NBK расте. Оваа вода е јако загадена дури достига до полисапробна вредност во зимскиот период. Вакво нагло зголемување отсуствува во летниот период, но се забележува незначително растење на сите овие параметри. Оваа најверојатно се должи на фактот што во летниот период оптималната температура, а и високата концентрација на органски материји

доведува до брзо зголемување на бактериската биомаса со настапување на поволниот период. Оваа предизвикува побрза конверзија на отпадниот органски материјал со зголемена потрошувачка на кислород, што на крајот резултира со истрошување на кислородот, појава на анаеробни услови и опаѓање на бројот на бактериите.

#### **Точка 4 – с. Тработивиште**

Високите вредности на испитуваните параметри во точката 3 покажуваат очигледно опаѓање во точката 4. Оваа вода, саприбиолошки спаѓа во  $\beta$  – мезосапробни води. Оваа се должи на улогата на микроорганизмите кои вршат самопречистување на водата. Внесените органски материји од фармите за свињи во Берово, во точка 3, почнуваат да се реминерализираат. Како последица на тоа се намалуваат слободните органски материји во водата и настануваат промени во условите за исхранување на микроорганизмите а со тоа се намалува нивната бројност и застапеност.

#### **Точка 5 – с. Драмче**

Процесот на самопречистување на водата продолжува и низ точката 5. Вредноста на индикаторите на загадувањето се уште пониски.

#### **Точка 6 – по брана Калиманци**

Во оваа точка забележани се минимални вредности за сите сезони. Фекалното загадување е на многу ниско ниво, а за лето и зима не се забележани претставници од родот *Escherichia coli* и *Clostridium perfringens* (NBK е еднаков на 0). Саприбиолошки тоа е  $\alpha$  – мезосапробна вода. Во оваа точка е релативно чиста, дава карактеристика дури како и изворските води во точките 1 и 2. Оваа се должи на природните физичко-хемиски и биолошки процеси кои настануваат во самата брана, како и на самопречистувачките процеси но во помала мера.

Поради брзината на водоносните слоеви низ сите 5 претходни точки, органските материји како и микроорганизмите немале шанса за седиментација. Ваков услов до некаде е постигнат во браната поради релативно мирните водоносни слоеви, каде органските материји како и микроорганизмите почнуваат да седиментираат. Дел од нив се залепуваат за бетонскиот ѕид од браната каде се вршат природните процеси на минерализацијата. Со тоа се намалува и степенот на загадувањето како и застапеноста и бројноста на индикаторите на загадувањето. Во овој процес значајна улога има и директната сончева радијација (особено во топлиите сезони). Таа со своето бактериоцидно и бактериостатичко дејство, делува врз бактериите во површинските слоеви на водата и допринесува исто така за намалување на нивната застапеност.

Водата која ја напушта браната како да се филтрирала и излегува бактериолошки чиста, а браната Калиманци како да ја игра улогата на „филтер“.

#### **Точка 7 – с. Зрновци**

Ваквата скоро изворски чиста вода во точката 6 почнува нагло да се оптоварува со органски материјал низ точките 7 и 8 за да во точката 9 (по Штип) достигне максимален степен на загадување. Во точката 7 се појавува слабо фекално загадување, се зголемува NBK, како и вкупниот број на хетеротрофни бактерии (психрофилни и мезофилни). Оваа вода е  $\beta$  – мезосапробна.

#### **Точка 8 – с. Долни Балван**

Овде настанува рапидно зголемување на сите параметри во сите сезони. Вкупниот број на хетеротрофни бактерии психрофилни достигнува вредност дури до 1 милион на литар во сезоната есен. Во периодот лето тие води се на граница меѓу  $\alpha$  – мезосапробни и  $\beta$  – мезосапробни, а во периодот есен-зима тие се полисапробни – јако загадени води.

Оваа загадување е како последица од фабриката за целулоза во Кочани. Оваа фабрика преку една помала притока Кочанска река, во реката Брегалница носи огромен квантитет на органска и неорганска материја која има своја карактеристична биомаса. Максимумот на продукција на оваа биомаса е во деветтата точка по Штип.

#### **Точка 9 – по Штип**

Вкупниот број на хетеротрофни психрофилни бактерии изнесува 11 милиони на литар за сезоната есен. Огромно е фекалното загадување а и NBK покажува висока вредност. За оваа допринесува големото количество на органски материји испуштени од фабриката за хартија и целулоза во градот Кочани. Овие органски материји ја носат со себе својата карактеристична микро флора, која се зголемува по текот на реката и максимумот на популационата крива на овие микроорганизми е по Штип, токму во деветтата точка.

Вака загадената Брегалница која во себе носи огромно количество на органски и неоргански материјал и огромен број на бактерии, се влива во реката Вардар, и придонесува за нејзино уште поголемо загадување.

## 5. ЗАКЛУЧОК

Следејќи и анализирајќи ги добиените резултати од микробиолошката контрола на водата во сите сезони, низ деветте испитувани точки, заклучуваме дека степенот и ефикасноста на самопречистувањето на реката Брегалница е на завидно ниво. Тоа особено добро може да се види низ точките 4, 5 и 6 каде и се намалуваат сите индикатори на загадувањето. Меѓутоа, количината на загадувачите од органско и неорганско потекло ги надминува границите на самопречистувачкиот капацитет на реката. Вакво пореметување предизвикуваат фармите за свињи во Берово, фабриката за флотација на руда, фабриката за целулоза и хартија во Кочани. Целокупниот загадувачки материјал неможе целосно да се реминерализира со самопречистувачкиот процес на реката. Факт е дека самопречистувачките процеси се одвиваат во оваа река и најверојатно, ако би се отстранило загадувањето, т.е. ако се престане со оптоварување на органски материјал, би се извршила комплетна и целосна реминерализација за одреден временски подолг период и оваа река би била релативно чиста.

Од добиените резултати се гледа дека вредностите на испитуваните параметри се најниски во летната сезона. Со зголемувањето на метаболичката активност на микроорганизмите во потопли услови се зголемува и силата на самопречистувањето. Во топлите сезони поголема е и автолизата на бактериите и габите, а се зголемува и исхраната на протозоите со бактерии. Значи самопречистувањето е поефективно лете за разлика од зиме, па затоа во зима се јавуваат повисоки вредности на сите испитувани параметри, за разлика од летната сезона кога имаат значително помали вредности.

Од графициите за сапробиолошка сезонска дистрибуција на вкупниот број хетеротрофни бактерии се гледа дека кривата на психрофилните и мезофилните бактерии се скоро паралелни, а поголемата вредност ја имаат психрофилните. Поголемо разидување се јавува во зимскиот период, што и нормално се очекува да бројноста на мезофилните бактерии да се намалува поради намалувањето на надворешните температури а кривата на психрофилните бактерии расте. Ваква законитост е забележана за сите испитувани точки.

Во психрофилни сапрофити спаѓаат скоро сите еколошки групи на бактерии чија оптимална температура е меѓу 18 и 15°C. Тука се вбројуваат нитрификациските, азотофиксаторските, целолитичките, метанските и многу други бактерии. За разлика од оваа група во мезофилните сапрофити има помал број на еколошки групи чиј оптимум е околу 37°C. Овде припаѓаат и патогени форми како и припадници на родот *Pseudomonas* и родот *Proteus* и други слични бактерии.

Без сомнение, од добиените резултати, најзабележително е намалувањето на застапеноста и бројноста на сите испитувани параметри по браната Калиманци. Бактериолошки „чиста“ вода истекува од браната, меѓутоа таа не се одржува таква. Со понатамошниот тек водите на реката Брегалница максимално се загадуваат, и вака загадени се вливаат во реката Вардар.

Добар предлог, според тоа, би било да се изгради брана пред вливањето на реката Брегалница во реката Вардар. Со тоа скоро изворски чисти води би се приклучувале кон текот на реката Вардар, за разлика од големиот квантитет на органски и неоргански материјал како и на огромен број на бактерии што се внесуваат со загадената Брегалница. Ако би се изградила ваква брана значително би ја подобрила критичната состојба на реката Вардар.

### Литература

Б. Оцевски (1979): МИКРОБИОЛОШКА ПРОУЧАВАЊА РЕКА ВАРДАРА. Микробиологија Vol 16, № 2, 163-172.

Б. Стлинович, Н. Футач (1985) : ПРИЛОГ ПОЗНАВАЊУ СТАНДАРДНЕ ВИЈЕДНОСТИ ВОДЕНИХ-ЕКО СИСТЕМА ПЛИТВИЧИХ ЈЕЗЕРА, Екологија Vol 20, № 1, 47-57.

СТАНДАРДНЕ МЕТОДЕ ЗА ФИЗИЧКО-ХЕМИСКО И БАКТЕРИОЛОШКО ИСПИТИВАЊЕ ВОДА (1961), 10 Библиотека савезног завода за здравствену заштиту – Београд (65-108).

Rheinheimer (1965): Micro-organisms and Water Pollution, 151-161.

W. Burrows (march 1969): Tehtbook of Microbiology the Biology of Microorganisms, 310-319.

Rheinheimer (1965): The Role of Bacteria and Fungi in the Cycling of Elements in Wathers.