

## Determinazione dei coliformi con la tecnica MPN nelle acque di balneazione

**Obiettivo:** stimare la quantità di coliformi presenti in una campione di acqua di fiume e ricavare un giudizio qualitativo sull'acqua.

### Materiali e sostanze usate:

- Autoclave, cappa
- Contenitore sterile, campione di acqua di fiume
- pipetta Pasteur, pipette sterili
- 15 provette con campanella di Durham
- portaprovette
- brodo lattosato (conc. semplice e doppia)
- brodo EC medium
- brodo verde brillante-lattosio-bile
- ansa
- bagno termostato
- penna vetrografica
- becco Bunsen
- termostato

### Prerequisiti:

Le tecniche sperimentali per lo studio microbiologico delle acque si riferiscono ai metodi standard MPN (metodo statistico del numero più probabile) e MF (filtrazione su membrana). Con il metodo MPN, mediante la tabella di McGrady, l'annotazione delle provette risultate positive o meno per ogni diluizione viene associata a un codice, a cui corrisponde un certo numero di batteri, che permette quindi di determinare la carica batterica in 100 ml d'acqua. Noi abbiamo eseguito la prova solo sul campione non diluito, perché diamo per assodato che le altre diluizioni risultino totalmente negative. Questa prova è finalizzata alla determinazione di coliformi in un campione di acqua di fiume. Con la tecnica MPN è necessario realizzare due prove: una presuntiva e una di conferma, sia per i coliformi fecali che per i totali.

### Procedimento:

Distribuire 10 ml di brodo lattosato nelle 3 serie di provette, in cui una provetta è a doppia concentrazione e le altre due a concentrazione semplice. Aggiungere con pipette sterili 10 ml di campione di acqua al primo gruppo, 1 ml al secondo e 0,1 ml al terzo.

Mettere le provette nell'incubatore per 72 ore a 37° C. Separare quindi le provette risultate negative entro le 48 ore, cioè che non hanno sviluppato gas, da quelle potenzialmente positive.

Bisogna eseguire quindi un test di conferma, sia per i coliformi totali che fecali. Riguardo ai totali, distribuire 10 ml di brodo verde brillante in un altro insieme di provette con campanella di Durham; inoculare con 0,1 ml di brodo lattosato prelevato dopo la risospensione dalle provette osservate dalle provette positive; mettere nell'incubatore a 37° C per 48 ore; osservare le provette con sviluppo di gas anche minimo e, dopo la consultazione della tabella, ricavare il valore MPN riferito a 100 ml di campione.

Il test di conferma per i coliformi fecali è stato eseguito in altra sede (con brodo EC medium e incubazione a 44°C per 48 ore) ed è stato registrato il risultato.

### Risultati e osservazioni:

Nel test effettuato sui dei coliformi totali, dopo 48 ore tutte le provette risultano ancora positive. Dopo 72 ore 2 provette risultano non positive: si tratta di 2 provette a concentrazione semplice con 0,1 ml di brodo. Perciò, consultando la tabella di McGrady, il valore MPN corrispondente è di 918.

N° tubi positivi su			Indice MPN per 100 ml di acqua
5 da 10 ml	5 da 1 ml	5 da 0,1 ml	
5	5	3	918

Lo stesso identico risultato è stato ottenuto con il test sui coliformi fecali: 2 provette sono risultate non positive.

### Conclusioni:

Essendo il risultato identico nei due test, ne deduciamo che tutti i coliformi totali sono fecali. Secondo le disposizioni di legge, essendo 2000 il valore limite di coliformi totali presenti in 100 ml di acqua, l'acqua potrebbe essere definita balneabile; ma il valore registrato nel test dei coliformi fecali, che non dovrebbe superare i 100 per 100 ml, è inaccettabile: il fiume non è balneabile in quel punto.

In base alla determinazione dei coliformi fecali è definito l'indice IFEC, che permette una classificazione delle acque. Tra 301 e 2000 colonie l'ambiente viene quindi definito "leggermente inquinato".