



## U.D. 4.4 ANALISI MICROBIOLOGICA DELL'ACQUA POTABILE

---

### OBIETTIVO:

Valutare se il campione in esame corrisponde ai requisiti di potabilità dal punto di vista microbiologico.

### PRINCIPIO:

Ricerca e quantificazione delle varie specie che rappresentano indicatori batterici di inquinamento e più precisamente:

- carica microbica totale
- coliformi totali e fecali
- streptococchi fecali

### MATERIALI E STRUMENTI:

#### MATERIALI CHIMICI

Cartine indicatrici

#### TERRENI DI COLTURA

PCA, Lactose broth, Brillant green bile broth, Azide dextrose broth, Ethyl violet azide broth

#### VETRERIA, ...

Pipette sterili da 10-1-0,1 ml, provette, provettoni, beute, campanelle di Durham, piastre sterili

#### STRUMENTI

Centrifuga, bagnomaria, autoclave, contacolonie, bilancia, termostato, bunsen

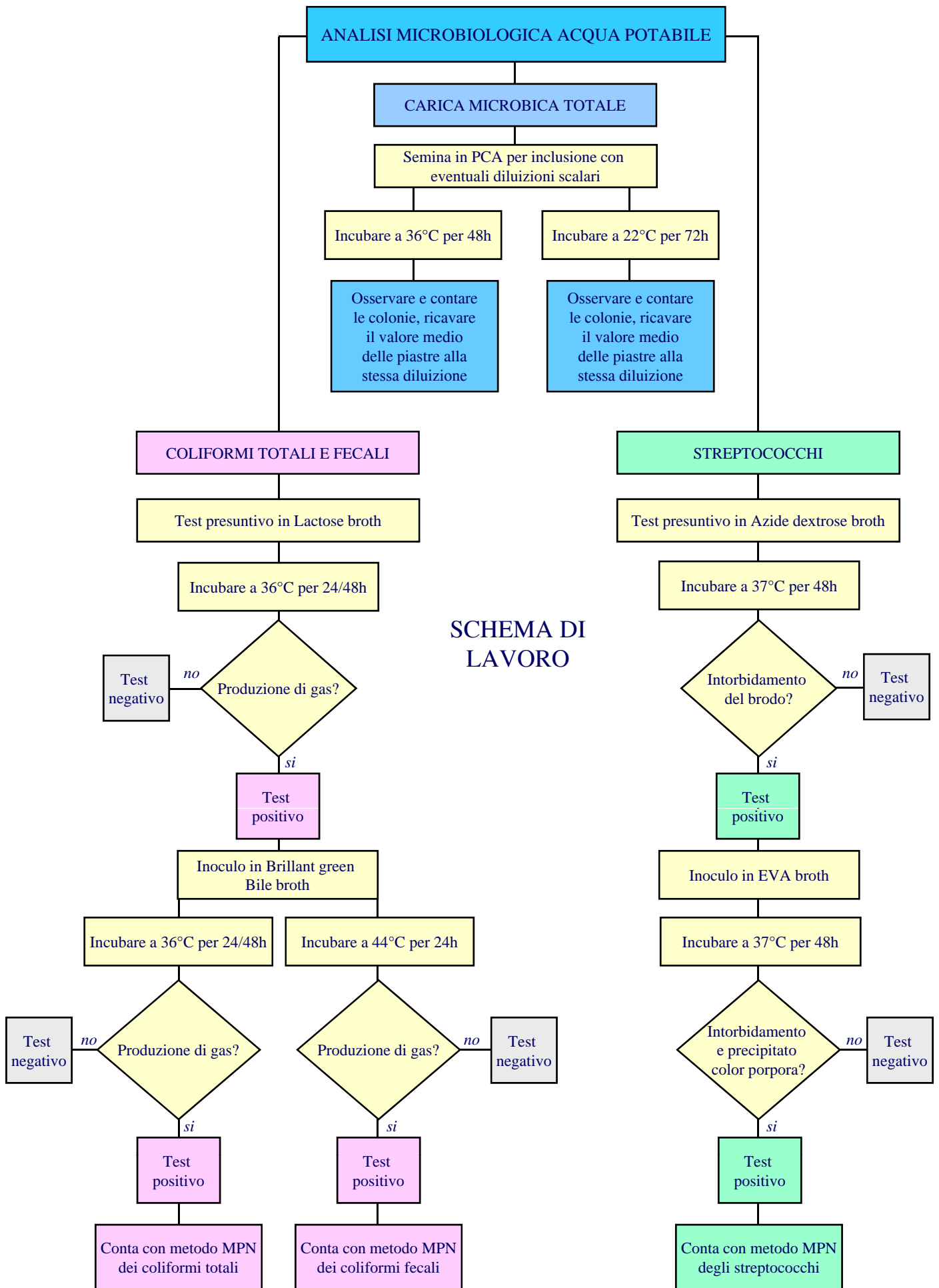


### PRELIEVO DEI CAMPIONI

Il prelievo viene effettuato con bottiglie sterili in vetro o in plastica con tappo a vite, chiusi da fogli di carta di alluminio.

Il prelievo sarà effettuato dopo aver fatto defluire l'acqua per alcuni minuti.

I campioni vanno sottoposti all'esame quanto prima, in ogni caso l'intervallo di tempo fra il prelievo e l'analisi non dovrà superare le 24h.

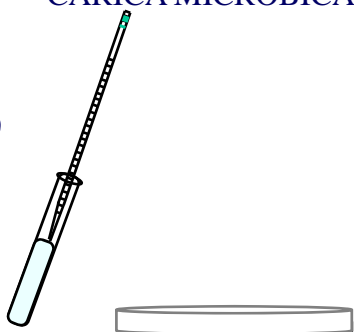


## METODICA

(1ª FASE)

a) CARICA MICROBICA TOTALE a 36° e 22°

1



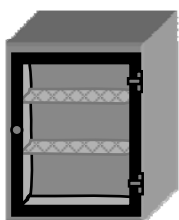
Trasferire con pipette sterili, 1 ml del campione di acqua in 4 piastre, se il campione è molto contaminato procedere a diluizioni (1:10, 1:100, 1:1000) con acqua dist. sterile (vedi modulo 4.1/4.2).

2



Piastrare con PCA mantenuto fuso in b.m. ruotare delicatamente le piastre per omogenizzare il campione nel terreno.

3



Incubare 2 piastre a 36° per 48h e le altre 2 a 22° per 72h.



Osservare le colonie cresciute con il contacolonia, ricavare il valore medio su ogni coppia di piastre, esprimere il risultato come colonie su agar/ml a 36° e 22°C.

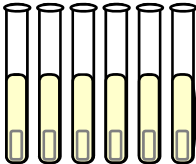


## METODICA

b) COLIFORMI TOTALI E FECALI (test presuntivo)

c) STREPTOCOCCHI FECALI (test presuntivo)

1

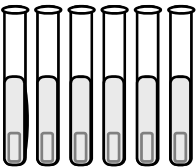
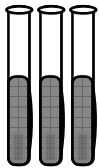


Preparare e sterilizzare (per i coliformi):

3 provettoni con campanella di durham contenenti ognuno 10 ml di Brodo lattosato a concentrazione doppia.

6 provettoni con campanella di durham contenenti ognuno 10 ml di Brodo lattosato a concentrazione normale.

2

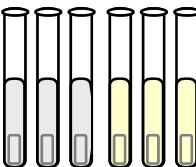
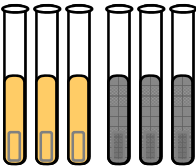


Preparare e sterilizzare (per gli streptococchi):

3 provettoni con campanella di durham contenenti ognuno 10 ml di Azide dextrose broth a concentrazione doppia.

6 provettoni con campanella di durham contenenti ognuno 10 ml di Azide dextrose broth a concentrazione normale.

3

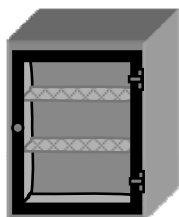


Seminare 10 ml di campione nei 3 provettoni contenenti il Brodo lattosato e 3 con l'Azide dextrose broth a concentrazione doppia.

Seminare 1 ml di campione nei 3 provettoni contenenti il Brodo lattosato e 3 con l'Azide dextrose broth a concentrazione normale.

Seminare 0,1 ml di campione nei 3 provettoni contenenti il Brodo lattosato e 3 con l'Azide dextrose broth a concentrazione normale.

4

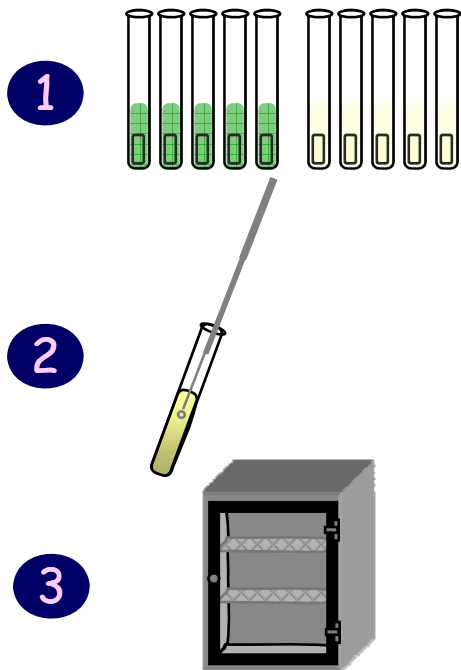


Incubare a 36° per 24-48 h tutti i test, leggere dopo 24 h considerando positive solo le colture che hanno crescita con sviluppo di gas e intorbidamento del terreno. Incubare di nuovo solo i tubi negativi per altre 24 h.

## METODICA

b) COLIFORMI TOTALI E FECALI (test di conferma)

c) STREPTOCOCCHI FECALI (test di conferma)



Preparare e sterilizzare:

tanti provettoni con campanella di durham quante sono le prove positive con 4 ml di Brilliant green bile broth (per i coliformi) e altrettante con 5 ml di EVA broth (per gli streptococchi).

Seminare 1 ansata di ogni brodocoltura positiva delle prove presuntive nei tubi contenenti il Brilliant green e 3 ansate in quelli contenenti EVA broth.

Incubare a 36° per 24h i coliformi totali,  
a 44° per 24h i coliformi fecali,  
a 36° per 48h gli streptococchi.

Osservare i risultati, la determinazione numerica dei batteri ricercati viene espressa rispetto al numero di tubi positivi (intorbidamento e produzione di gas per i coliformi, sedimento color porpora per gli streptococchi) e esprimere la concentrazione dei batteri come MPN/ml di campione, cioè di numero più probabile.

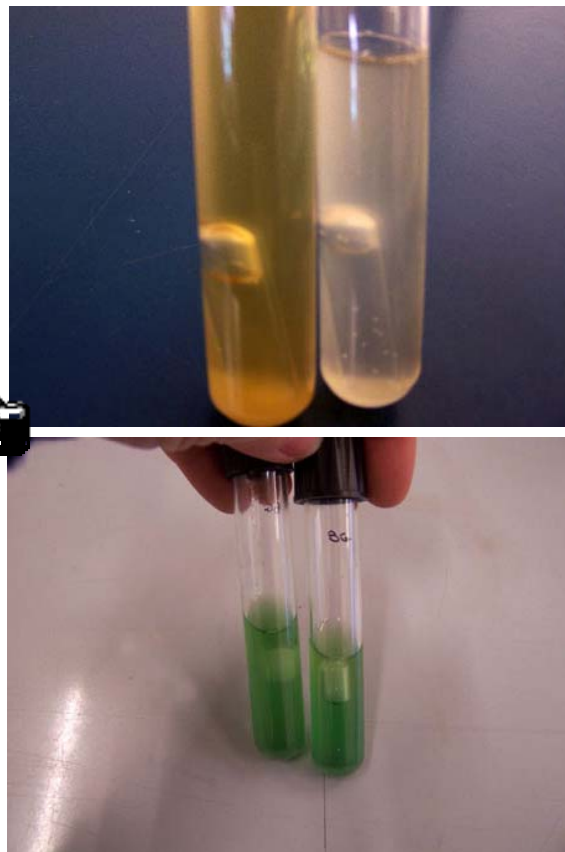


Tabella MPN

Numero tubi positivi su			MPN per 100 ml	Limiti fiduciari	
3 da 10 ml	3 da 1 ml	3 da 0,1 ml		inferiori	superiori
0	0	1	3	<0,5	9
0	1	0	3	<0,5	13
1	0	0	4	<0,5	20
1	0	1	7	1	21
1	1	0	7	1	23
1	1	1	11	3	36
1	2	0	11	3	36
2	0	0	9	1	36
2	0	1	14	3	37
2	1	0	15	3	44
2	1	1	20	7	89
2	2	0	21	4	47
2	2	1	28	10	150
3	0	0	23	4	120
3	0	1	39	7	130
3	0	2	64	15	380
3	1	0	43	7	210
3	1	1	75	14	230
3	1	2	120	30	380
3	2	0	93	15	380
3	2	1	150	30	440
3	2	2	210	35	470
3	3	0	240	38	1300
3	3	1	460	71	2400
3	3	2	1100	150	4800



Parametri microbiologici  
dalla Gazzetta Ufficiale – maggio 1985  
Caratteristiche di qualità delle acque destinate al consumo umano

Parametro ed unità di misura	Valore guida	Valore limite	osservazioni
Coliformi fecali/100 ml	-	0	Non più del 5% dei campioni esaminati nell'arco dell'anno e non più di 2 campioni prelevati nello stesso punto possono eccedere tale limite. Comunque mai superiore a 5/100 ml.
Coliformi totali/100 ml	-	0	
Conteggio colonie su agar/1 ml a 36°C a 22°C	10 100	- -	Alte cariche batteriche richiedono indagini e accertamenti appropriati.
Streptococchi fecali/100 ml	-	0	