

La microbiologia delle acque minerali: aspetti generali ed analitici

G. DE FELIP

Laboratori di Microbiologia, Istituto Superiore di Sanità, Roma.

I minuziosi e ripetuti controlli condotti in un'acqua minerale tendono fondamentalmente ad accertare la sua purezza, e tutta la tematica a monte, legata alla captazione, adduzione, distribuzione in contenitori, è intesa, in definitiva, a salvaguardare questo requisito di base.

Tale concetto « chiave » è, credo, fondamentalmente condiviso da tutti: vi sono, tuttavia, aspetti più strettamente tecnici e, in particolare microbiologici che, così come è dato rilevare del resto in altri settori della microbiologia stessa e, direi, della biologia in genere, non sono facilmente definibili o, meglio, coagulabili in formule rigide e fisse.

Nel corso del presente Congresso, eminenti specialisti di vari Paesi approfondiranno tutti gli aspetti tecnico-microbiologici, ai quali ho accennato. Io mi limiterò, in questa relazione, a poche osservazioni di natura generale e ad alcune considerazioni di natura prettamente analitica.

Per quanto concerne le opere di captazione e di adduzione, che per la loro stessa natura sono di prevalente interesse ingegneristico, è noto che esse sono, in genere, pienamente soddisfacenti anche sotto il profilo microbiologico. Eppure è possibile, anche se non frequentemente, rilevare piccole omissioni, per esempio a livello delle condutture di scarico di « troppo pieno » che possono lasciare adito a dubbi sotto il profilo della protezione da eventuali fattori esterni per omissione, ad esempio, di adeguate reti, pozze-sifone, ecc.

Sono altresì note le garanzie offerte dai moderni sistemi di imbottigliamento; tuttavia, nel corso di alcuni sopralluoghi ho potuto talora rilevare, nella zona d'aria immediatamente circostante la sede di riempimento propriamente detta, la presenza di flora microbica qualitativamente sovrapponibile a quella reperibile nell'acqua stessa.

Tale rilievo potrebbe essere spiegato con la formazione di zone « spray » attorno agli ugelli di riempimento e, quindi, alla formazione di una specie di « circuito chiuso » sotto il profilo microbiologico.

Questo « circuito » può essere interrotto intensificando, ove necessario, quelle misure generali di controllo microbiologico della zona di riempimento eliminando, ad esempio, eventuali turbini d'aria nella zona, o facendo un largo impiego di lampade germicide.

Sempre in tema di osservazioni generali, ricorderò ancora l'alto grado di efficienza raggiunto dai moderni sistemi di lavaggio delle bottiglie: eppure, nel corso di nostre indagini, abbiamo rilevato, in bottiglie prelevate all'uscita della macchina lavatrice, un numero decisamente elevato di colonie microbiche.

Aggiungo subito che tali reperti non sono frequenti, costituendo, piuttosto, una eccezione alla regola. Essi, tuttavia, ci riconducono alla tematica legata, più che all'uso di un determinato detergente, alle modalità di « recupero », dal commercio, dei contenitori usati.

Quanto fin qui rapidamente e sommariamente riportato è inteso a ricordare, ancora una volta ove fosse necessario, che tutto, anche se perfetto, è ulteriormente perfezzibile e che il rilievo di piccole anomalie può evitare implicazioni igieniche-microbiologiche ben più serie.

A questo punto, però, e a scanso di ogni equivoco, sia ben chiaro che l'imbottigliamento di un'acqua minerale è qualche cosa di profondamente diverso dalla preparazione di prodotti farmaceutici come, ad esempio, soluzioni iniettabili in vena!

Vorrei, adesso, esporre alcune considerazioni di natura analitica legate allo studio di taluni parametri microbiologici applicabili alle acque minerali naturali.

Inizierò con una serie di considerazioni sulla determinazione della carica microbica saprofitaria nelle acque minerali naturali: sul valore e sul significato di tale determinazione, come è noto, si è lungamente e, talora vivacemente discusso, in varie occasioni e a vari livelli; tutti noi conosciamo a tale proposito quanto è stato detto, in particolare, a livello della CEE. Non mi propongo nell'ambito della mia relazione, di prospettare soluzioni di natura normativa ma desidero illustrare, ripeto, soltanto alcune implicazioni prettamente analitiche del problema che, a mio avviso, è veramente complesso sotto tutti gli aspetti.

La determinazione della flora microbica saprofitaria delle acque minerali, determinazione frequentemente eseguita, peraltro, nella « routine » microbiologica in genere, comporta, nonostante la semplicità di esecuzione, una serie di limiti e di fattori di variabilità legati alla natura stessa dell'analisi.

Tutti noi sappiamo, infatti, come il concetto della colonia « monocitogenetica » originata, cioè, da una singola cellula microbica, concetto che sta alla base del metodo di numerazione su substrati agarizzati, sia un principio biologico non sempre e non fedelmente riscontrabile nella realtà analitica.

Da qui la necessità di standardizzare, con una accuratezza che ad un esame superficiale potrebbe apparire eccessiva, tutte le fasi inerenti l'analisi, tale necessità peraltro, trova riscontro nelle normative di vari paesi e, più recentemente, nei metodi analitici in corso di definizione a livello della CEE.

Tuttavia, non vi sarà standardizzazione sufficientemente rigorosa, sia nella scelta del diluente, sia nella definizione del terreno culturale, sia nelle modalità di analisi, nella temperatura e durata di incubazione nonché, infine, nella lettura e interpretazione dei risultati, tale da eliminare le cause di variabilità derivanti dal metodo stesso e, direi, dalla fisiologia delle cellule microbiche oggetto di tale determinazione.

Per quanto concerne la scelta del diluente, vorrei solo accennare al fatto che, data la natura prevalentemente oligotrofa della flora microbica presente nelle acque minerali, sembra valido il criterio di scegliere un solvente il più povero possibile di nutrimenti, ma dotato di proprietà di isotonia e di concentrazione idrogenionica atte a non interferire con le complesse strutture di superficie della cellula batterica.

Una soluzione di fosfato monopotassico, per esempio, potrebbe rispondere allo scopo, così come abbiamo potuto rilevare in talune indagini comparative condotte con diluenti di più largo impiego.

Per quanto concerne la temperatura di incubazione o, meglio, le temperature di incubazione, mi sembra che più che i dati in assoluto, rilevabili alle due temperature, sia significativo il confronto tra le due serie di dati.

Non voglio qui aprire il discorso della evoluzione, nel tempo, della normale flora microbica soprafitaria riscontrabile nelle acque minerali, ma voglio soltanto ricordare che, di norma, la carica microbica soprafitaria evidenziabile dopo incubazione dei substrati colturali a 20 °C è più elevata di quella evidenziabile a 37 °C, e ciò in linea di massima è ovvio data l'origine tellurica di tale flora; un capovolgimento di tale rapporto può avere significati diversi la cui natura ed origine va approfondita con accertamenti idonei.

Da quanto finora accennato si può rilevare che ho parlato soltanto di substrato nutritivo agarizzato e non ho fatto riferimento alla numerazione in gelatina che, come facilmente riscontrabile da vari documenti (CNR, CEE, ecc.) è considerata attualmente di scarso e controverso significato.

Per quanto concerne la durata dell'incubazione del substrato colturale per la determinazione della carica microbica soprafitaria a 37 °C ho più volte constatato come, a livello di varie normative, vi sia una certa discordanza tra 24 ore e 48 ore di incubazione.

Per una medesima acqua, dopo 24 ore di incubazione, è possibile numerare, ad esempio, 10 colonie/ml; il numero delle macrocolonie può sensibilmente aumentare dopo 48 ore di incubazione; intendo riferirmi a colonie rilevabili ad occhio nudo.

Non è possibile, peraltro, stabilire un rapporto fisso tra il numero delle colonie ed il periodo di incubazione del terreno colturale; tali differenze, ovviamente, sono legate a fattori diversi derivanti in primo luogo dalla natura delle specie microbiche presenti nell'acqua minerale in esame.

Per quanto si riferisce al conteggio delle colonie microbiche rilevabili alla fine del periodo di incubazione, esso viene effettuato, come è noto, prendendo in considerazione solo le piastre con un numero di colonie compreso tra 30 e 300.

Ciò corrisponde, indubbiamente, a necessari criteri di standardizzazione nella fase, probabilmente, più critica di tutta l'analisi. Bisogna ricordare, tuttavia, che secondo tale criterio, il limite di precisione del conteggio in una piastra contenente 300 colonie è di circa 3.5 volte maggiore del conteggio eseguito su una piastra con 30 colonie; in definitiva si procede, in tal caso, al paragone tra conteggi che presentano gradi di precisione significativamente diversi, compresi, precisamente, tra ± 11 e ± 37 %.

Il limite inferiore di 30 colonie è presumibilmente legato anche al generale impiego di diluizioni in ragione 10; bisogna però ricordare che, per tale limite inferiore, l'errore di campionamento incide in misura sensibile. Tale errore, invece, sarà ovviamente trascurabile per il limite superiore per il quale potrebbe sussistere soltanto un errore dovuto alla densità delle colonie microbiche.

Tuttavia, secondo accertamenti, non più recenti, di Wilson, in una piastra con 500 colonie l'errore di densità si aggirerebbe sul 5 % circa. A questo punto ricorderò, così come in precedenza fatto in altre sedi, che per livelli di conteggio compresi tra 80 e 320 colonie per piastra, il limite di precisione varierà tra ± 11 % e ± 22 %, così come evidenziato da Cowell e Morisetti [1].

Dopo avere rapidamente esaminato talune luci ed ombre di un metodo universale, quale appunto quello del « Plate Count » vorrei accennare ad alcune prospettive offerte, anche nell'analisi delle acque minerali, da metodiche che si potrebbero definire « di avanguardia » in un settore analitico « tradizionale » come quello della determinazione della carica microbica.

Tra le metodiche automatizzate per il conteggio delle colonie batteriche vorrei adesso riferire sulla nostra esperienza relativa all'impiego del Coulter Count (C.C.) per il conteggio delle microcolonie batteriche nelle acque minerali.

Tale metodo, proposto da Tolle e Coll. [2] si basa sul principio che i batteri presenti nel campione in esame, in presenza di un idoneo terreno colturale e in determinate condizioni di incubazione, danno luogo a microcolonie aventi un volume minimo di circa $6.000 \mu^3$.

Il conteggio delle microcolonie è possibile in quanto il terreno di coltura nel quale si sono sviluppate viene disciolto in un'apposita soluzione elettro-

litica; la sospensione così ottenuta viene aspirata da un apposito capillare e immessa nel circuito analizzatore, dove viene rilevata la differenza di resistenza elettrica tra microcolonie ed elettrolita. Tali differenze provocano impulsi che vengono opportunamente amplificati ed automaticamente registrati.

Nel corso di nostre indagini [3] abbiamo portato una serie di piccole modifiche alla metodica originale di Tolle: di queste, la più rilevante consiste nella sostituzione della gelatina, quale addensante del terreno base di coltura, con carragenina. Tale sostituzione ci ha permesso di eseguire le prove di numerazione delle microcolonie batteriche non solo a 20° C, così come era possibile con la metodica originale, ma anche a 37° C; in tal modo è stato possibile procedere ad una serie di numerazioni comparative condotte con il nuovo metodo e con il metodo tradizionale del « Plate Count ».

In sintesi la numerazione viene eseguita nel modo seguente: un volume noto di acqua minerale viene addizionato con terreno di coltura opportunamente concentrato e contenente carragenina. Le prove vengono eseguite in duplice incubando, rispettivamente, a 20° C e a 37° C per 8-12 ore circa, i campioni in esame.

Alla fine del periodo di incubazione si aspira un'aliquota del substrato che viene diluita con la soluzione di elettrolita. Tale sospensione viene portata al *counter* per la numerazione delle microcolonie.

Da numerazioni fatte in parallelo con il metodo « Plate Count » si è potuto rilevare un buon coefficiente di correlazione (pari a 0,90) tra i due metodi.

Così come innumerevoli metodi, anche quello ora descritto presenta vantaggi e svantaggi.

I vantaggi si possono così riassumere:

- l'apparecchiatura automatica semplifica l'analisi e riduce gli errori massimali dovuti all'analista;
- si realizza un notevole risparmio di tempo, non solo nell'incubazione ma anche nella lettura dei risultati; una sola persona può esaminare, in un'ora circa, più di cento campioni.

Gli svantaggi sono quelli rilevabili in altre metodiche automatizzate poiché è necessaria una messa a punto accurata e laboriosa dell'apparecchio; è necessario, inoltre, standardizzare minuziosamente tutte le varie fasi della tecnica; solo a queste condizioni il conteggio elettronico può fornire risultati attendibili.

Da rilevare, infine, che affinché il conteggio sia statisticamente valido, il numero di cellule microbiche presenti nel campione in esame deve essere di almeno dell'ordine di 10^3 .

Sono in corso nuove indagini per effettuare il conteggio « diretto » dei batteri nelle acque con il predetto metodo elettronico automatizzato.

Vorrei ora riportare alcune nostre esperienze sul metodo detto delle « Droplets ».

Trattasi di una numerazione eseguita mediante semina del campione in esame e successive diluizioni in « Plate Count agar»: il terreno di coltura, una volta inoculato, viene deposto, sotto forma di singole gocce, in piastre di Petri, a mezzo di pipette. La lettura, dopo 24 ore di incubazione, viene eseguita contando le colonie sviluppatesi nelle gocce di agar, a mezzo di uno stereomicroscopio.

Da quanto abbiamo potuto dedurre da una modesta esperienza con tale metodo, esso permette di conseguire un notevole risparmio di tempo oltre, ovviamente, ad una notevole economia di terreno nutritivo e di vetreria. La lettura dei risultati, tuttavia, non è sempre agevole e spesso si rilevano variazioni significative rispetto ai valori trovati con il « Plate Count » tradizionale.

Vorrei concludere questa « carrellata » su alcuni aspetti della determinazione della carica microbica col ricordare, come più volte fatto in sedi diverse, che il parametro della carica microbica non può, di per sé essere rigido, essendo legato, oltre che a problemi di campionamento e di significatività degli stessi campioni analizzati, anche a fenomeni biologici complessi la cui progressione è esponenziale.

Secondo tale concetto, pertanto, l'espressione delle variazioni della popolazione microbica in un'acqua minerale dovrebbe, comunque, ed a prescindere da ogni suo significato, essere fatta indicando il logaritmo della concentrazione delle cellule microbiche rilevabili nel campione in esame.

Per quanto concerne la ricerca dei germi indici di inquinamento fecale ricorderò, tra le tecniche più recenti, quella proposta da Bachrach [4]: essa si basa, per la ricerca dell'*Escherichia coli* nelle acque, sull'impiego di un substrato nutritivo contenente, tra l'altro, lattosio marcato con C¹⁴.

Rilevando, a mezzo di scintillatore in fase liquida, la radioattività dell'anidride carbonica liberata dall'attacco del lattosio è possibile, dopo poche ore di incubazione, evidenziare fino ad una cellula di *E. coli*/ml di acqua. In presenza di un più basso contenuto in *E. coli*, il periodo di incubazione sarà più lungo.

Desidero ora accennare ad alcune tecniche per studiare, anche sotto il profilo quantitativo, talune attività idrolasiche di germi isolati dalle acque.

È a tutti noto che i risultati degli accertamenti biochimici condotti a fini tassonomici, possono talora fornire risposte poco chiare; nell'intento di avere ulteriori elementi di valutazione può, talora, essere di aiuto una risposta quantitativa.

È il caso, per esempio, della prova di idrolisi della gelatina eseguita nella ricerca di alcune *Pseudomonas*. Ebbene, impiegando, quale substrato per l'attività proteolitica, delle lastre fotografiche in precedenza sottoposte a normale processo di sviluppo, è possibile ottenere, saggiando filtrati di brodoculture dei ceppi in esame, aloni di idrolisi, proporzionali all'attività proteolitica dei germi confrontabili, peraltro, non solo tra loro, ma con quantità note di proteasi a titolo noto.

Quanto sopra accennato può essere applicato alla ricerca quantitativa di altre idrolasi microbiche, come fosfatasi, amilasi, pectasi, ecc. scegliendo, ovviamente, di volta in volta un substrato idoneo [5].

Tali indagini possono, talora, essere di ausilio in ricerche particolari, nelle quali interessi studiare più da vicino il comportamento di determinati ceppi batterici.

La relazione, a questo punto, è arrivata alla fine. Essa è stata lacunosa, incompleta e, forse, episodica.

Ma il fine era quello di dimostrare ancora una volta, ammesso che ve ne fosse bisogno, come tutti i problemi, anche quelli più dibattuti possono, se approfonditi, apparire ancora più complessi!

Summary (*General and analytical considerations on the microbiology of mineral waters*). — The Author sets forth a number of technical-analytical considerations concerning the microbiology of mineral waters, discussing particularly the criteria for the determination of the microbial saprophytic charge and describing some recently-perfected methods.

Résumé (*Considérations générales et analytiques sur la microbiologie des eaux minérales*). — L'Auteur expose une série de considérations technico-analytiques relatives à la microbiologie des eaux minérales faisant ressortir en particulier les principes concernant la détermination de la charge microbique saprophytaire, décrivant en outre certaines méthodes mises au point récemment.

BIBLIOGRAFIA

1. COWELL, N. D. & M. D. MORISETTI. 1969. Microbiological techniques - Some statistical aspects. *J. Sci. Food. Agric.* **20**: 573-579.
2. Commission des Communautés Européennes. 1969. Document de travail présenté par la délégation allemande. 23.036/VI/69-F-Rev. I.

3. DE FELIP, G. M. BELLI, L. TOTI & V. FALBO. 1974. Determinazione della carica microbica mediante numerazione delle microcolonie eseguita al contatore elettronico di particelle. *Ann. Ist. Super. Sanità.* **10**: 215-223.
4. BACHRACH, U. & Z. BACHRACH. 1974. Radiometric method for the detection of coliform organisms in water. *Appl. Microbiol.* **28**: 169-171.
5. DE FELIP, G. 1975. Enzimi di interesse applicativo nella microbiologia e tecnologia degli alimenti. *Riv. Soc. Ital. Sci. Aliment.* **5**: 143-158.