

Significato qualitativo e quantitativo della flora microbica nelle acque minerali naturali durante la loro commercializzazione

G. BIFFI GENTILI e A. BELLI

Reparto Medico-Micrografico, Laboratorio Provinciale d'Igiene e Profilassi, Firenze

INTRODUZIONE

La presenza e il comportamento dei batteri nelle acque minerali conservate in contenitori è stato oggetto da molti anni di numerose osservazioni e ricerche, ma anche di imprecise ed erranee interpretazioni.

Malgrado che il problema, nelle linee generali, sia stato ormai abbastanza ben puntualizzato, tanto dal lato qualitativo che quantitativo, purtuttavia con frequente ricorrenza — ci riferiamo al nostro Paese — vengono avanzate, talvolta anche dagli stessi operatori sanitari, critiche, riserve o addirittura condanne di un'acqua minerale naturale del commercio in base ad un singolo esame, magari effettuato su di un solo campione, dal quale risulti una carica microbica elevata. E ciò continua a verificarsi anche dopo che una circolare del 1972 del Ministero della Sanità [1] ha richiamato l'attenzione degli interessati sull'argomento ammettendo esplicitamente la possibilità di un aumento anche sensibile della carica microbica nelle acque non gasate. Tale circolare così si esprime: « Poiché è dato riscontrare, soprattutto nelle acque non gasate e particolarmente in quelle imbottigliate in recipienti di materiale plastico, che il numero totale di colonie può subire un aumento anche sensibile, deve essere accertato caso per caso e su un numero significativo di campioni, il motivo dell'aumento stesso al fine di distinguere se esso è dovuto a moltiplicazione di batteri autotrofi o a contaminazione dall'esterno ».

Talvolta la polemica raggiunge la stampa d'informazione dove può subire involontariamente deformazioni tali da conferire al fatto un aspetto scandalistico, o addirittura il magistrato che dovrà emettere un giudizio scegliendo fra opinioni contrastanti di periti.

Noi riteniamo di aver individuato tre dei motivi che possono riportare in discussione il problema. Il primo riguarda l'adozione di limiti batteriologici seguendo un criterio scolastico riportato sui classici trattati d'igiene

(es. carica microbica in agar non superiore a 50/ml e in gelatina non superiore a 500/ml), senza considerare che tali limiti, per altro molto permissivi, sono indicati per l'acqua di uso potabile all'origine.

Un altro motivo è certamente rappresentato dalla sostituzione all'agar nutritivo, relativamente povero, usato fino a qualche anno fa per l'esame batteriologico delle acque, con agar più ricco a base di triptosio e di estratto di lievito che consente la crescita di un numero di colonie di gran lunga maggiore, rispetto al precedente.

Il terzo motivo è correlato all'equivoco che può ingenerare in persone non competenti la dichiarazione, diciamo pure un po' ambigua, riportata sull'etichetta della bottiglia, di « acqua batteriologicamente pura » o « purissima », perché può apparire che tale dichiarazione si riferisca all'acqua contenuta in quella bottiglia, mentre, com'è noto, si riferisce ai risultati degli esami richiesti a suo tempo per l'autorizzazione alla vendita.

A questo riguardo, francamente, se fossimo chiamati ad esprimere un giudizio in qualsiasi sede, non ci sentiremmo disponibili a dichiarare « batteriologicamente pura » un'acqua minerale con una carica di migliaia di batteri/ml anche in completa assenza di microorganismi patogeni e di monitori di contaminazione fecale.

Il titolo che è stato assegnato alla nostra relazione, preso così alla lettera, appare molto impegnativo e non abbiamo certo la pretesa di recare un contributo definitivo all'argomento. Le nostre osservazioni, anche in considerazione del breve periodo di tempo avuto a disposizione, si limiteranno a una rapida rassegna della letteratura sull'argomento e alla produzione di risultati parziali già ottenuti in esperienze che abbiamo in corso su di un'acqua oligominerale. Precisiamo che le osservazioni e le considerazioni verteranno sul comportamento della sola carica microbica saprofito in contenitori di vetro e di cloruro di polivinile (PVC), con esclusione quindi dei contenitori metallici e di quelli polistratificati a base di carta.

Ovviamente, considerato che gli argomenti oggetto delle numerose relazioni di questo congresso non possono avere confini ben delimitati, è possibile che la nostra relazione possa sovrapporsi in parte a quella di altro oratore, e di ciò ci scusiamo fin da ora.

PARTE BIBLIOGRAFICA

Fino dal 1913 Pergola [2] aveva espresso chiarissimi concetti sull'origine e sul comportamento della flora microbica delle acque minerali.

« Un contenuto batterico quantitativamente basso depone per un imbottigliamento o molto recente (antecedente alla naturale moltiplicazione microbica) o molto lontano (quando sia già in atto il processo di autodepurazione...). Un contenuto batterico elevato o indica trascuratezza nell'im-

bottigliamento o, più probabilmente, depone per un imbottigliamento fatto già da un lasso di tempo sufficiente a permettere la moltiplicazione dei microorganismi, estranei o meno alla flora batterica dell'acqua, ma esistenti in essa al momento della chiusura delle bottiglie ».

Questo A., in definitiva, forse per primo, puntualizza che la flora batterica dell'acqua minerale conservata può essere rappresentata da batteri propri dell'acqua, presenti in essi fino dall'emergenza, ed anche da batteri derivanti da contaminazione secondaria per trascuratezze igieniche connesse con le fasi che precedono l'imbottigliamento. Independentemente dall'origine, la carica batterica, scarsa all'inizio, va incontro a un processo di moltiplicazione al quale segue una fase di declino. Questi semplici e fondamentali concetti sono tuttora validi.

Per quanto si riferisce alle specie dei batteri dell'acqua all'origine, si è spesso parlato, non del tutto appropriatamente, di « autotrofi ».

Le acque profonde sono in genere particolarmente povere sia di sostanze nutrienti che di microorganismi. I batteri presenti sono per la massima parte « acquicoli » (il loro sviluppo ottimale avviene cioè in ambiente idrico) ma sono presenti anche batteri che di norma vivono e si moltiplicano nel terreno.

Le ricerche che ordinariamente vengono condotte per determinare la specie e la carica microbica di un'acqua mettono in evidenza solo una parte di questi microorganismi. Infatti, gli autotrofi, che svolgono un ruolo essenziale nei cicli dei nutrienti, hanno richieste di coltura tali da non potersi, per la maggior parte, sviluppare nei comuni terreni organici [3] in quanto sono spesso inibiti dalla presenza di peptone e, in genere, di aminoacidi.

I batteri acquicoli che vengono evidenziati in agar nutritivo sono quindi in genere eterotrofi o, se vogliamo, oligotrofi la cui caratteristica saliente è la capacità di vivere e riprodursi in ambienti che contengono bassissime quantità di sostanze organiche. Wright e Hobbie [4] hanno trovato che valori di 1-10 $\mu\text{g/l}$ di glucosio sono sufficienti allo sviluppo dei batteri acquicoli. Essi sono saprofiti la cui deficienza metabolica è l'incapacità di trasformare il C inorganico in C organico ma, avendo a disposizione un composto organico del carbonio, possono sintetizzare tutti gli altri materiali di cui necessitano.

Per quanto attiene alla flora batterica che con maggior frequenza si isola dalle acque minerali all'emergenza riportiamo le osservazioni di Buttiaux e Boudier [5] che si sono maggiormente interessati all'argomento. Questi AA. annoverano, in ordine decrescente di frequenza i gruppi degli *Xanthomonas*, *Pseudomonas*, *Achromobacter* e *Flavobacterium* considerandoli autotrofi perché capaci di svilupparsi in acque nelle quali le sostanze organiche non sorpassano i 0,1-0,2 mg/l. Osservano ancora che le *Pseudomonas* e le *Xanthomonas* si sviluppano lentamente, ma abbondantemente, nelle acque « piatte » e che le *Pseudomonas* si sviluppano più attivamente nelle

acque molto mineralizzate; inoltre la luce ha una debole azione inibitrice e la quantità di aria contenuta nel recipiente svolge un ruolo favorente la moltiplicazione.

La contaminazione secondaria dell'acqua dopo l'emergenza può dipendere da una pluralità di cause: cattivo stato di conservazione e di manutenzione delle condotte e dei manufatti (pozzetti di decantazione e serbatoi) e dei macchinari di imbottigliamento, incompleto risanamento industriale delle bottiglie, impiego di acqua non pura per i risciacqui, mancata protezione delle bottiglie da inquinanti pulviscolari prima dell'apposizione del tappo, impiego di tappi contaminati, ecc.

La contaminazione secondaria è piuttosto frequente come dimostrano controlli effettuati da diversi AA. Zimmermann [6] su 35 bottiglie vuote prelevate da fabbriche germaniche dopo il trattamento, riscontrò in 13 di esse la presenza di coliformi, in 6 di *Pseudomonas*, in altre di miceti e stafilococchi; Cremonesi e Fabio [7], in bottiglie vuote prelevate da 6 fabbriche di bibite riscontrarono cariche batteriche elevate e la presenza di coliformi in 15 campioni su 29 esaminati; Gehring [8], esaminando un numero cospicuo di bottiglie vuote provenienti da diverse fabbriche dell'Unione delle Sorgenti Minerali germaniche lavate con procedimenti automatici ottenne nel 9% dei casi cariche batteriche decisamente elevate.

Le osservazioni che i vari AA. riportano sulla presenza di microorganismi nelle acque, sull'andamento delle curve di crescita e sui valori numerici massimi raggiunti, partono dalle più disparate condizioni di sperimentazione con grande varietà di tipi di acqua esaminati, di lavaggio delle bottiglie, di temperature di stoccaggio, di intervalli di esame, di condizioni di luminosità, di terreni colturali e di temperature di incubazione e, quindi, pur recando un apporto alla conoscenza dell'argomento, sono difficilmente confrontabili fra di loro. In questi ultimi anni, l'introduzione del cloruro di polivinile (PVC) nel campo degli alimenti e delle bevande ha stimolato la ripresa delle ricerche basate fondamentalmente sul confronto fra carica microbica di acque conservate in bottiglie di vetro e acque conservate in bottiglie di questo materiale plastico.

Le osservazioni di maggiore spicco, quantunque per alcuni aspetti contrastanti con quelle di altri AA., risultano quelle di Buttiaux e di Buttiaux e Boudier degli anni 1959-1960. Buttiaux [9] raccomanda innanzi tutto di ricercare fra la comune carica microbica alcuni microorganismi potenzialmente patogeni e cioè la *Pseudomonas aeruginosa*, di provenienza «organica», differenziandola dalle *P. fluorescens* (saprofita), e il *Chromobacterium violaceum*; ritiene che all'emergenza il numero totale delle colonie dei batteri aerobi debba essere costante e se sorpassa i 10/ml, le specie in causa devono essere le medesime e non avere alcun significato peggiorativo; le bottiglie, dopo il lavaggio, non dovrebbero contenere più di 100 batteri aerobi; nelle

acque conservate, una elevata carica microbica potrebbe essere attribuibile tanto a sviluppo di « autotrofi » quanto a insufficiente pulizia dei recipienti. Conclude richiedendo il massimo rigore nell'esclusione di tutti i microorganismi testimoni di contaminazione pericolosa invitando per altro le autorità responsabili ad interpretare prudentemente il tenore totale in batteri.

Buttiaux e Boudier [5] affermano che nelle acque minerali « piatte » il numero di batteri coltivabili a 37 °C e a 20–22 °C è spesso inferiore a 1/ml alla fine dell'imbottigliamento; dopo uno–sei mesi di conservazione a temperatura ambiente il primo non è modificato, ma si trovano da 1.000 a 200.000 germi che si sviluppano a 20–22° C; più raramente tali germi sorpassano il milione. In ricerche sperimentali condotte su campioni di acqua medio-minerale e minerale, sterilizzati e frazionati in flaconi di vetro neutro e successivamente insemenzati con stipiti di *Pseudomonas* e di *Xanthomonas* e conservati, parte al buio e parte alla luce, ottengono valori massimi varianti da 2×10^7 a 2×10^{10} ; osservano che la luce ha un'azione inibitrice e ipotizzano che gli altissimi valori della carica microbica che si raggiungono in queste condizioni sperimentali, rispetto a quelli che si ottengono nelle ordinarie bottiglie di acqua minerale, siano attribuibili al cospicuo quantitativo di aria contenuta nei flaconi. Concludono che, attenendosi alle prescrizioni dell'attuale legislazione, è impossibile evitare il fenomeno della moltiplicazione degli « autotrofi » nelle acque stoccate e che, conseguentemente, è impossibile fissare una norma valida per il numero tollerabile di batteri aerobi che si sviluppano a 20–22 °C e propongono pertanto un trattamento battericida tale da non alterare le caratteristiche chimiche e fisiche delle acque minerali distribuite in recipienti ermeticamente chiusi.

Ancora, Buttiaux [9,10], dopo aver confermato che in acque correttamente trattate possono riscontrarsi cariche batteriche superiori a 100.000/ml e che, allo stato attuale della legislazione, nessun rimedio efficace può essere apportato, propone un trattamento fisico che possa sopprimere questi batteri (generalmente *Xanthomonas*, *Pseudomonas* sp. e *P. fluorescens*). Afferma che le acque minerali con tali cariche microbiche sono verosimilmente non pericolose perché i germi in causa non posseggono alcun potere patogeno conosciuto e, d'altra parte, milioni di adulti e di bambini le ingeriscono per lunghi anni senza presentare alcun sintomo anormale. Tutt'al più, la moltiplicazione batterica eccessiva può talvolta provocare inconvenienti di carattere merceologico: gusto e odore un po' sgradevoli, lieve intorbidamento di origine batterica peraltro avvertibile solo da un occhio molto esercitato. Per quanto attiene alla carica batterica a 37 °C con 24 h di incubazione, l'A. dichiara di avere esaminato 12.000 campioni di acque minerali francesi fra « piatte » e « gasate », riscontrando una carica microbica poco elevata, inferiore a 1/ml nell'ottanta per cento dei casi e a 10/ml nel tredici per cento dei casi e propone pertanto quest'ultimo limite come norma. Fischietti [11–13]

conduce una serie di interessanti osservazioni sui fenomeni di crescita e di autodepurazione di vari tipi di acqua conservati in contenitori fortemente contaminati così come si presentano di ritorno allo stabilimento di imbottigliamento. Cominazzini [14] conserva a 20-22 °C bottiglie in vetro di acqua minerale esaminandone alcune ogni 3 giorni per 33 giorni ed eseguendo colture in agar (plate count agar) a 37 °C per 48 h e a 20 °C per 96 h e ottiene valori massimi di 5.900 nelle colture a 20 °C intorno al 15° giorno, e sempre inferiori a 10 nelle colture a 37 °C.

In questi ultimi anni si sono susseguite numerose ricerche comparative sul comportamento della flora microbica in acqua contenuta in recipienti di vetro e di plastica.

Un editoriale del Bollettino dei Medici della Svizzera Italiana [15] afferma che la proliferazione dei germi è più rapida nelle bottiglie di plastica rispetto a quelle di vetro; le autorità Svizzere di controllo delle derrate alimentari hanno fissato alcuni anni orsono a 10.000 (a 20 °C) il numero massimo di germi/ml per le acque « piatte », ma, constatato che tale direttiva è difficile da applicare, propongono il confronto degli stipiti riscontrati nei contenitori con quelli dell'acqua all'origine.

Del Vecchio e Fischietti [16] esaminano il comportamento della flora microbica di un'acqua oligominerale, di una medio-minerale e di una minerale propriamente detta all'imbottigliamento fino alla 25^a settimana di conservazione (non viene indicata la temperatura) con colture a 37 °C in agar e a 20 °C in gelatina e concludono che i processi di moltiplicazione batterica sono più intensi e vivaci nei campioni di acqua mantenuti in contenitori di plastica rispetto a quelli mantenuti in contenitori di vetro, mettendo in relazione il fenomeno con la migrazione di particelle di sostanze plastificanti dalle pareti del contenitore all'acqua. Al riguardo descrivono alterazioni microscopiche dall'aspetto di piccoli avvallamenti rotondeggianti sulla superficie interna delle bottiglie nelle quali era stata conservata l'acqua per 25 settimane. I valori massimi nelle colture a 37 °C da acque conservate in vetro sono di 1660 per la oligominerale, 240 per la medio-minerale e 20.500 per la minerale p.d.

Baldini e Coll. [17] eseguono ricerche su di un'acqua oligominerale bicarbonata distribuita in bottiglie di vetro lavate industrialmente e tappate alcune con tappo corona, altre con tappo di sughero sterile e in bottiglie di plastica sterile conservando il tutto a 25 °C. Osservano che il massimo sviluppo si ottiene intorno al 15° giorno e affermano prudentemente che i dati da loro ottenuti sembrano deporre per una lieve stimolazione della moltiplicazione nei contenitori di plastica e in quelli di vetro con un tappo corona munito di guarnizione interna di plastica. È da rilevarsi che gli AA., nelle colture a 37 °C, dal 10° al 20° giorno hanno ottenuto valori superiori alle 1.000 unità.

Pasquini e Coll. [18] sottopongono alle indagini microbiologiche due acque, una oligominerale e una medio-minerale, imbottigliate entrambe sia in contenitori di vetro che di plastica, prelevando i relativi campioni dal commercio e determinando, fra l'altro, la carica microbica subito, dopo incubazione a 35° C per tre mesi e a 20 °C per quattro mesi e concludono che la carica batterica totale dell'acqua contenuta in recipienti di plastica è costantemente superiore a quella delle medesime acque imbottigliate in vetro.

Savino e Coll. [19] escludono, in base a ricerche sperimentali, la penetrazione di microorganismi dall'esterno verso l'interno dei contenitori di plastica ma non escludono, in via ipotetica, che l'aumento del contenuto microbico nei contenitori di plastica sia dovuto alla presenza di microorganismi che si sviluppano (di preferenza a 20 °C) a spese del materiale plastico, forse insediandosi negli avvallamenti e nelle rugosità rilevate da alcuni AA. nelle bottiglie di plastica.

Ricerche sull'impermeabilità delle materie plastiche agli agenti patogeni vengono condotte anche da German e Panouse [20] che dimostrano l'impermeabilità al virus Newcastle dei recipienti di plastica integri.

Masson e Chauvin [21] in base a dati di numerose analisi effettuate in questi ultimi anni constatano che spesso il numero di germi delle acque minerali in bottiglie sorpassa i 10.000/ml, limite generalmente ammesso (Svizzera) per questo prodotto e che la cifra di 1 milione viene raggiunta e sorpassata abbastanza frequentemente. Secondo questi AA. l'acqua conservata in bottiglie di plastica presenta una carica microbica inferiore a quella conservata in vetro.

PARTE SPERIMENTALE

Accenniamo a ricerche batteriologiche su campioni di acqua oligominerale conservati in bottiglie di vetro e di PVC in varie condizioni. Poiché tali ricerche sono tutt'ora in corso e sono anche correlate con indagini biofarmacologiche svolte da altro ricercatore, ci limitiamo in questa sede ad anticipare qualche sintetica osservazione, riservandoci, in prosieguo di tempo, al termine delle ricerche, di riferire in dettaglio sui risultati definitivi e di trarne le debite conclusioni.

Vengono stoccate al buio rispettivamente alla temperatura di 20 °C e di 37 °C numerose bottiglie riempite meccanicamente con la stessa acqua oligominerale e precisamente:

- 1) bottiglie di vetro da l 1,5 (lavate industrialmente);
- 2) bottiglie di vetro da l 1,5 (sterili);
- 3) bottiglie di PVC da l 1,5 (prodotte industrialmente);
- 4) bottiglie di PVC da l 1,5 (sterili).

Parte delle bottiglie sterili è stoccata anche alla luce, sempre a 20 °C e a 37 °C. I lotti stoccati sono quindi complessivamente 12.

La sterilizzazione delle bottiglie di vetro e di PVC è stata effettuata a mezzo di raggi gamma (0,5 megarad) da istituto specializzato.

Allo scopo di poter meglio evidenziare l'eventuale diversità di comportamento della carica microbica dell'acqua conservata in bottiglie di vetro « lavate industrialmente », rispetto a quella conservata in bottiglie « sterili », il procedimento di lavaggio e di risciacquo industriale delle prime è stato opportunamente ridotto, in modo da ottenere che in queste la flora batterica al tempo 0 non fosse rappresentata esclusivamente dai batteri di origine acquicola, ma anche da batteri risultanti dall'ambiente non idrico.

Al tempo « 0 » e dopo 2-4-8-16-30-45-60-90-120-150-180 gg (la ricerca continua) vengono prelevate 10 bottiglie da ciascun lotto e, previa opportuna diluizione, si effettuano semine in agar (plate count agar Difco) che sono poste ad incubare sia a 20 °C (96 h) che a 37 °C (48 h). Viene quindi effettuata la media dei risultati ottenuti dalle 10 bottiglie di ciascun lotto.

I risultati ottenuti sino ad ora possono essere così sintetizzati:

Carica microbica al tempo « 0 ».

Si ottiene una carica microbica media dell'acqua di 42 unità/ml per le bottiglie di vetro « industriale » mentre per le bottiglie di vetro e di PVC sterili la carica è nulla o irrilevante ($< 1/ml$); nelle bottiglie PVC « industriali » (prodotte con procedimento di formazione e di estrusione che comporta l'impiego di elevate temperature) la carica microbica media risulta bassa ($< 1/ml$ a 37 °C e $4/ml$ a 20 °C).

Colture a 20 °C da bottiglie di vetro e di PVC « industriali » e « sterili » conservate a 20 °C e al buio.

a) Nelle bottiglie di vetro « industriali » (con discreta carica microbica al punto 0) si verifica, rispetto a quelle « sterili », un più rapido e cospicuo accrescimento nei primi giorni (12.200 contro 1.500/ml dopo quattro giorni): in ambedue le serie viene raggiunto un valore massimo (40.000/ml) di eguale entità dopo trenta giorni; nella seconda, la fase di declino appare più rapida.

b) In ambedue le serie di bottiglie di PVC « industriali » e « sterili » si notano comportamenti molto simili fra loro e cioè rapido e cospicuo aumento della carica nei primi giorni di conservazione (rispettivamente 16.000 e 13.000/ml dopo 4 gg), raggiungimento dei valori massimi dopo 30 gg (rispettivamente 28.000 e 20.000/ml per le industriali e le sterili), fase stazionaria fino a 60 gg, quindi rapida fase di declino.

Colture a 20 °C da bottiglie di vetro e di PVC « industriali » e « sterili » conservate a 37 °C e al buio.

L'andamento delle curve di crescita è analogo a quello delle corrispondenti serie conservate a 20 °C ma i valori ottenuti sono costantemente e

proporzionalmente meno elevati. Meno rilevabili appaiono le differenze fra vetro « industriale » e vetro « sterile » rispetto alle corrispondenti bottiglie conservate a 20 °C.

Culture a 37 °C da bottiglie in vetro e PVC conservate a 20 °C e 37 °C al buio.

In queste prove il dato più saliente è costituito da curve con valori proporzionalmente meno elevati rispetto a quelli delle colture a 20 °C; inoltre, i valori massimi vengono raggiunti più precocemente (2-8 gg per le bottiglie conservate a 20 °C e 2-4 gg per quelle conservate a 37 °C); infine, la fase di declino appare più accentuata. In nessun caso il valore massimo ottenuto è inferiore a 1.000.

Confronto fra prove condotte da bottiglie in vetro e PVC conservate al buio e alla luce a 20 °C e a 37 °C.

Non si rilevano differenze significative.

Confronto fra culture da bottiglie in vetro e in PVC conservate nelle identiche condizioni.

Allo stato attuale di queste ricerche non sono documentabili significative differenze tra i valori massimi della carica microbica raggiungibile in vetro e in PVC, apparendo questi leggermente superiori ora nell'uno, ora nell'altro caso, a seconda della temperatura di conservazione delle bottiglie e della temperatura di coltura. Rispetto alla curva di crescita da bottiglie in vetro, quella ottenibile dalle bottiglie in PVC denota una fase di crescita più rapida e una fase stazionaria più prolungata.

Coefficienti di variabilità.

In tutte le prove abbiamo ottenuto coefficienti di variabilità per cento molto elevati, maggiori per il vetro (fra 35 e 200 %) rispetto al PVC (fra il 16 e 90 %); le differenze di comportamento fra bottiglie industriali (vetro e PVC) e quelle sterili non sono state significative.

Specie batteriche isolate.

Nei controlli dell'acqua all'emergenza si evidenziano solo tre specie batteriche che, in ordine alle caratteristiche culturali e biochimiche, possono ascrivere ai generi *Flavobacterium*, *Achromobacter* e *Xanthomonas*.

Nelle bottiglie, oltre alle precedenti specie, si sono rinvenuti anche batteri acromogeni ossidasi con leggera produzione di pigmento fluorescente che diventa bruno dopo qualche giorno, e pertanto questi ultimi microorganismi sono probabilmente da inserirsi nel genere *Pseudomonas*.

Dopo 180 giorni prevalgono numericamente i batteri acromogeni.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

In base ai dati forniti ripetutamente dalle esperienze di numerosi AA., appare ormai chiaramente documentato che nelle acque minerali naturali conservate si verifica un processo di moltiplicazione microbica la cui vivacità ed intensità può variare a seconda della quantità di batteri presenti, del tipo di acqua, della qualità e della temperatura e del tempo di incubazione, della presenza di aria, dell'esposizione alla luce, del tipo di contenitore, ecc.

A questa fase di crescita ne segue una di declino, più o meno accentuata e più o meno prolungata, andando incontro l'acqua stessa ad un vero e proprio processo di autodepurazione. Si tratta di un fenomeno naturale non evitabile e in un certo senso non riducibile perché un contenitore di acqua minerale appena chiuso contiene un certo quantitativo di microorganismi di origine acquicola o tellurica, presenti nell'acqua stessa fino dall'emergenza e, sovente, in quantità e qualità variabili, altri microorganismi che sfuggono ai più accurati processi di risanamento dei contenitori e dell'ambiente di imbottigliamento.

Ciò premesso, riteniamo irrealizzabile una eventuale proposta di fissare limiti della carica microbica, almeno nelle colture a 20 °C, sembrandoci assurda, o quantomeno priva di realismo, la pretesa di imbrigliare con norme un fenomeno tanto complesso. Basti pensare anche a situazioni paradossali che potrebbero scaturire da eventuale applicazione di norme del genere: sarebbero infatti accettate acque nelle quali la scarsa carica microbica o, addirittura, l'assenza della medesima potrebbe derivare da un forte invecchiamento con processo di autodepurazione già completato, oppure da trattamento chimico o fisico eseguito fraudolentemente, oppure ancora da tracce di antisettici sfuggiti ai bagni di risciacquo, mentre potrebbe essere scartata una buona acqua imbottigliata da pochi giorni nella quale è in atto una fase di moltiplicazione batterica molto attiva. Nei recipienti in PVC il processo di moltiplicazione appare accelerato e protratto nel tempo e, secondo alcuni, più intenso; ma se anche così fosse, non ci sembra che il problema di fondo possa cambiare.

Deve essere poi considerato che un'esperienza ormai pluridecennale non attribuisce alcun significato di patogenicità ai microorganismi che quasi costantemente sono presenti nelle acque minerali naturali conservate. Sia però chiaro che, mentre riteniamo si debba essere permissivi nei confronti della carica microbica saprofitica, si deve essere estremamente rigorosi nell'escludere, nella maniera più tassativa, in cospicui quantitativi di acqua prelevati con criteri di campionamento statisticamente attendibili, la presenza di monitori di contaminazione fecale e delle specie batteriche potenzialmente patogene (*P. aeruginosa*, *C. Violaceum*, ecc.).

È altresì auspicabile che ogni sorgiva utilizzata per la produzione di acqua minerale sia sottoposta ad accurato e prolungato studio batteriologico al fine di catalogare le specie microbiche ivi presenti per poterne stabilire l'identità o meno con quelle isolate dall'acqua dopo l'imbottigliamento.

Per quanto riguarda le colture a 37 °C, sempre nell'acqua conservata, i dati forniti dalla letteratura ci lasciano molto perplessi: di fronte a cariche di poche unità segnalate da alcuni AA. anche dopo prolungata conservazione, si oppongono quelli di migliaia di unità riscontrate da altri. Le cause di questa grande difformità di risultati possono essere solo in parte attribuibili alle metodologie e alle tecniche impiegate: in particolare, la durata di incubazione delle colture e la scelta dei terreni colturali. È noto infatti che alcuni ricercatori adottano l'incubazione per 24 h, altri (specialmente gli Italiani) per 48 h.

Orbene, i risultati che si ottengono per uno stesso campione di acqua a 37° dopo 24 h sono completamente diversi da quelli che si ottengono dopo 48 h, essendo i secondi spesso superiori di oltre dieci volte rispetto ai primi. Analoghi risultati possono aversi nelle colture in agar povero (a base di estratto di carne e di peptone) rispetto all'agar più ricco (a base di triptosio e di estratto di lievito).

Appare pertanto auspicabile che i metodi per l'esame batteriologico dell'acqua vengano opportunamente definiti ed unificati, almeno a livello della CEE.

Per altro, i motivi tecnici sopra accennati non sono sufficienti a spiegare tanta diversità di risultati anche perché, almeno secondo la nostra esperienza, i batteri acquicoli, normalmente in causa nelle acque minerali, possono crescere anche in agar a 37 °C dopo 48 h di incubazione.

Ciò premesso, riteniamo che le ricerche a questo riguardo debbano essere opportunamente ampliate ed approfondite sui vari tipi di acque minerali all'origine e conservate in varie condizioni, secondo un programma prestabilito e seguendo una metodologia uniforme prima di giungere ad eventuali proposte di limiti della carica microbica a 37 °C. Raccomandiamo, qualora fossero proposti limiti alle cariche microbiche delle acque minerali naturali, che si tenga debito conto degli alti valori dei coefficienti di variabilità che si ottengono nella conta delle colonie e pertanto dovrà essere prescritto un campionamento che possa fornire medie attendibili dei risultati.

In ogni caso resta più che valida la raccomandazione di escludere la presenza di monitori di contaminazione fecale e di batteri potenzialmente patogeni.

Per quanto attiene alla dichiarazione di « acqua batteriologicamente pura » posta sull'etichetta della bottiglia, riteniamo che questa possa essere conservata purché risulti chiaramente che si riferisce al controllo di qualità (documentabile) della partita alla quale appartiene la bottiglia stessa.

Summary. — (*Qualitative and quantitative significance of microbial flora in natural mineral waters*). — On the basis of data reported in literature concerning the saprophytic bacterial flora of natural mineral waters bottled in glass or in PVC containers and in view of the results obtained during their own investigations, the AA. consider it impossible to establish a limit to the charge of bacterial flora in agar at 20 °C and believe that any possible proposal concerning rules limiting the bacterial charge at 37 °C requires more detailed study and preliminary controls.

In any case, they propose to apply the strictest vigilance in excluding the presence of any sign whatever of fecal contamination or of potentially pathogenic bacterial types (f.i. *P. aeruginosa*) in all water samples; they also suggest to require that the performance of comparative tests be extended to the stages preceding bottling.

Current experimental investigations reveal that the multiplying process seems to be accelerated and more protracted in time in waters bottled in PVC containers than in those kept in glass containers.

Résumé. — (*Signification qualitative et quantitative de la flore microbique des eaux minérales naturelles pendant leur commercialization*). — Sur la base des données décrites par la littérature scientifique concernant la flore des microbes saprophytes des eaux minérales naturelles conservées dans des conteniteurs en verre et en PVC et sur la base des résultats de leurs propres recherches, les Auteurs pensent qu'il ne soit pas possible d'établir une limite à la charge des bactéries en agar à 20 °C et qu'une éventuelle proposition de normes pour limiter la charge microbique à 37 °C nécessite des études plus approfondies et des contrôles préliminaires.

En tout cas les Auteurs proposent d'appliquer la plus stricte rigueur pour exclure des échantillons d'eau la présence de tout moniteur de contamination fécale et d'espèces microbiques potentiellement pathogéniques (p.e. *P. aeruginosa*) et aussi d'exiger que des opportunes recherches soient accomplies avant de procéder à l'embouteillage.

Les recherches expérimentelles actuellement en cours d'exécution démontrent que dans les conteniteurs en PVC le procès multiplicatif est plus accéléré et prolongé que dans les conteniteurs en verre.

BIBLIOGRAFIA

1. Circolare n. 80 del 3 giugno 1972 del Ministero della Sanità.
2. PERGOLA, M. 1913. Le acque minerali in vendita a Tripoli. Citato da D'ARCA SIMONETTI, A. 1968. Indagine batteriologica sulle acque minerali imbottigliate. *Nuovi Ann. Ig. Microbiol.* **19**: 497-506.

3. LEES, H. 1955. *Biochemistry of autotrophic bacteria*. Butterworths Scientific Publications, London.
4. WRIGHT, R. T. & J. E. HOBBIÉ. 1966. Use of glucose and acetate by bacteria and algae in aquatic systems. *Ecology*, **47**: 447-464.
5. BUTTIAUX, R. & A. BOUDIER. 1960. Comportement des batteries autotrophes dans les eaux minérales conservées en récipients hermétiquement clos. *Ann. Inst. Pasteur Lille*, **11**: 43-54.
6. ZIMMERMANN, W. 1958. Zur Hygiene der Mineralwasser - fabrikation. Ergebnisse von Desichtigungen und Untersuchungen. *Arch. Hyg. Bakteriol.* **142**: 609-631.
7. CREMONINI, G. & U. FABIO, 1960. Indagine sulla produzione di bibite analcoliche e gassate nella città di Modena. *Riv. Ital. Ig.* **20**: 277-290.
8. GEHRING, A. 1959. Über die Ergebnisse 5 - jhrigher bakteriologischer Kontrollen in Mineralbunnenbetrieben. *Arch. Hyg. Bakteriol.* **143**: 456-472.
9. BUTTIAUX, R. 1960. La surveillance bactériologique des eaux minérales en bouteilles et en boîtes. *Ann. Inst. Pasteur Lille*, **11**: 23-28.
10. BUTTIAUX, R. 1959. Le contrôle bactériologique des eaux minérales. *Rev. Hyg. Med. Soc.* **7**: 131-147.
11. FISCHETTI, M. 1968. Comportamento nel tempo della flora microbica saprofitica presente in acque minerali imbottigliate. Nota I: ricerca condotta nel 1966-1967 su un'acqua medio-minerale. *Nuovi Ann. Ig. Microbiol.* **19**: 757-772.
12. FISCHETTI, M. 1968. Comportamento nel tempo della flora microbica saprofitica presente in acque minerale imbottigliate. Nota II: ricerca condotta nel 1967 su un'acqua oligo-minerale. *Nuovi Ann. Ig. Microbiol.* **19**: 773-781.
13. FISCHETTI, M. 1968. Comportamento nel tempo della flora microbica saprofitica presente in acque minerali imbottigliate. Nota III: ricerca condotta nel 1967-1968 su un'acqua minerale. *Nuovi Ann. Ig. Microbiol.* **19**: 782-790.
14. COMINAZZINI, C. 1975. Comunicazione personale.
15. Bollettino dei Medici della Svizzera Italiana: n. 11, Nov. 1971.
16. DEL VECCHIO, V. & M. FISCHETTI. 1972. Andamento nel tempo della flora saprofitica presente in acque minerali: confronto fra contenitori di vetro e contenitori di plastica. *Nuovi Ann. Ig. Microbiol.* **23**: 257-277.
17. BALDINI, L., E. CURRENTI & E. SCANDELARI. 1972. Rilievi e osservazioni sulle modificazioni nel tempo della flora microbica naturale di un'acqua minerale imbottigliata in relazione al giudizio igienico. *Ann. Sanità Pubb.* **33**: 1009-1021.
18. PASQUINI, R., A. SAVINO & G. SCARSELLATI SFORZOLINI. 1974. Analisi microbiologiche di acque minerali del commercio imbottigliate in recipienti di vetro e di plastica. *Ann. Sclavo.* **16**: 433-434.
19. SAVINO, A., R. PASQUINI & G. SCARSELLATI SFORZOLINI. Indagini sulle cause del differente contenuto microbico di acque minerali imbottigliate in contenitori di vetro e di plastica. *Ann. Sclavo.* **16**: 434-436.
20. PANOUSE-PERRIN J. & A. GERMAN. 1968. *Prod. Probl. Pharm.* **23**: 249.
21. MASSON, A. & D. CHAUVIN. 1973. Etude de quelques phénomènes pouvant influencer la charge microbienne des eaux minérales en bouteilles plastiques et verre. Laboratoire Cantonal de Lausanne.