

Microbiologia delle acque minerali naturali

RAFFAELLA LA MORGIA

M.o.m. Biotossicologia – Laboratorio di Sanità Pubblica - Dipartimento della Prevenzione - ASL 10 - Firenze

Riassunto - *Le operazioni di controllo e di vigilanza delle acque minerali naturali sono espletate dai Dipartimenti di Prevenzione delle ASL e dai Dipartimenti ARPAT, secondo le disposizioni indicate dalla legislazione vigente (DM 12.11.1992 n.542; DM 13.01.1993; Circolare MinSan 13.09.1991 n 17; Circolare Regionale 02.03.1994).*

I controlli microbiologici sono effettuati su campioni prelevati alla captazione, all'impianto d'imbottigliamento, ai depositi (degli stabilimenti e della distribuzione) ed ai punti vendita. Essi hanno la duplice finalità di verificare la corretta applicazione delle norme di buona fabbricazione da parte delle Aziende produttrici e di monitorare la qualità igienico-sanitaria di un prodotto di così largo consumo.

La legislazione vigente a tal riguardo prevede, con descrizione precisa e dettagliata, le modalità di campionamento ed i parametri da determinare con i relativi metodi di analisi. Si riportano i risultati delle analisi eseguite negli ultimi cinque anni sui campioni ufficiali e sulle bottiglie presentate dai consumatori in seguito al riscontro di anomalie, quali sapori e/o odori particolari, presenza di corpi estranei, etc. Si conferma che nelle acque minerali, la presenza di batteri "indesiderati" resta un'evenienza rara ma proprio perché possibile, il livello di sorveglianza deve necessariamente essere mantenuto alto.

Natural Mineral Water Microbiology

Summary - *Control and "supervisory" operations related to "Mineral Waters" are carried out by the Sickness and Disease Prevention Department of the Local Health Authority and the ARPAT Departments in accordance with current legislation as laid out in a series of Ministerial and other Decrees (MD 12.11.1992, N°.542; MD 13.01.1993; MC 13.09.1991 n°.17, Regional Circular 02.03.1994 n° 1). The microbiological quality controls are carried out on samples taken from the source, the bottling plant, the deposits (of the bottling factories and the distribution centres) as well as the sales points. These Quality Controls have a twofold objective: to verify the correct application of the norms related to quality production as regards the Production Companies, and to continuously monitor the Hygiene-Health Quality of a widespread consumer product. Current legislation envisages a precise and detailed description of the sampling methods used, as well as the parameters and the related methods of analyses adopted. Herewith, are the results of the analyses carried out over the last five years on official samples and on the bottles presented by consumers following the discovery of anomalies therein such as those related to taste, and/or specific odours, the presence of foreign bodies, etc.*

We can confirm the fact that the presence of "undesirable" bacteria in Mineral Waters is a rare occurrence. However, given the fact that it is, nonetheless, a possibility, the degree of surveillance must, of necessity, be high.

Parole chiave: acque minerali naturali, microbiologia, metodi di analisi

PREMESSA

Per definizione l'acqua minerale naturale è un'acqua microbiologicamente pura che origina da una falda o giacimento sotterraneo e proviene da una sorgente o più emergenze naturali o perforate. La purezza microbiologica a cui si fa riferimento non coincide con la sterilità ma include la presenza di batteri saprofiti ed innocui che caratterizzano la singola acqua, in stretta relazione al contesto geografico e geologico in cui si trova. Pertanto le acque minerali sono acque "vive", dotate di un loro microbismo naturale che deve restare quello originario, protetto da qualsiasi tipo di contaminazione da parte di batteri in grado di causare, in particolari condizioni legate alla tipologia, alla virulenza del ceppo, al loro numero ed alle difese dell'ospite, manifestazioni di tipo morboso. Una volta imbottigliata, la carica batterica, bassa all'origine, può subire un incremento, dovuto alla tipologia dell'acqua stessa, destinato poi ad esaurirsi per processi di autodepurazione, in poche settimane. La conoscenza della tipologia dei batteri che caratterizzano un'acqua minerale (*Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Chromobacterium*, *Xantomonas*, *Flavobacterium* etc.) è determinante per consentire di monitorare nel tempo gli eventuali cambiamenti che possono verificarsi. Talvolta accade che stoccaggi impropri o trasporti effettuati in condizioni non idonee, diano luogo a proliferazioni microbiche anche di notevole entità.

Tale evenienza, pur non rappresentando un problema per la salute umana, può determinare comunque la formazione di sottoprodotti "indesiderati", in grado, quanto meno, di indurre alterazioni di carattere organolettico, come ad esempio conferire all'acqua sapori anomali. Di qui la necessità di mantenere bassa la flora microbica iniziale, assicurando le idonee modalità di trasporto e conservazione delle bottiglie, come riportato sulle stesse etichette: "Conservare al riparo dalla luce in luogo fresco, asciutto, pulito e senza odori". A tal proposito, un ruolo importante sembra rivestire il contenitore in PET (Polietilene Tereftalato), il materiale plastico oggi più utilizzato per la fabbricazione delle bottiglie di acqua minerale. Infatti, interessanti studi effettuati sulla interazione esistente tra diverse tipologie di contenitori e flora microbica presente nell'acqua minerale, portano a ritenere che l'indebolimento della struttura polimerica del PET, determinata da ripetuti stress termici, da esposizione diretta e prolungata alla luce solare, causi, oltre ad un aumento della permeabilità ai gas, anche la cessione di sostanze utilizzabili dai batteri stessi come nutrienti. La contaminazione dell'acqua minerale da parte di germi "esterni" può essere impedita proteggendo opportunamente i locali dell'impianto delle linee di imbottigliamento, mediante depurazione dell'aria forzata e consentendo l'accesso al personale dotato di indumenti protettivi.

La conoscenza e la sorveglianza dei vari punti critici dell'intero processo produttivo consentono alla e nella stessa Azienda di monitorare di continuo la qualità dell'acqua minerale imbottigliata; ai Servizi di Igiene Pubbli-

ca, mediante i controlli ufficiali, compete verificare la corretta applicazione delle norme di buona fabbricazione e la conformità del prodotto alle disposizioni legislative specifiche. Un'acqua minerale inquinata, così come una comune acqua potabile, può veicolare batteri, protozoi, miceti, alghe e virus sia direttamente, quando ingerita tal quale, sia attraverso alimenti, di cui costituisca materia prima. A tal proposito va ricordato il suo diffuso impiego nella ricostituzione del latte in polvere e di altri alimenti liofilizzati, destinati alla prima infanzia. L'ingestione diretta di un'acqua contaminata, specie a digiuno, può risultare particolarmente pericolosa, poiché il veloce transito attraverso lo stomaco non consente l'attacco antibatterico da parte dei succhi gastrici, a differenza di quanto accade con alimenti solidi. Pertanto la purezza microbiologica naturale deve essere garantita e mantenuta mediante controlli giornalieri effettuati alla fonte e nei vari punti di prelievo, lungo tutta la linea di imbottigliamento, da parte delle Aziende produttrici. Ai Dipartimenti di Prevenzione delle Aziende Sanitarie compete svolgere le operazioni di vigilanza e controllo in materia igienico-sanitaria. Le analisi chimiche e microbiologiche sono effettuate dai Laboratori dei Dipartimenti ARPAT e ASL.

MATERIALI E METODI

La normativa di riferimento, relativa agli aspetti microbiologici, in materia di acque minerali è la seguente:

1. DM 12.11.1992 n. 542 - Regolamento recante i cri-

teri di valutazione delle caratteristiche delle acque minerali naturali (Capo III-Art.7, 8, 9, 10);

2. Circolare Ministero Sanità 13.09.1991 n.17 - Analisi microbiologiche acque minerali naturali;

3. DM 13.01.1993 - Metodi di analisi per la valutazione delle caratteristiche microbiologiche e di composizione delle acque minerali naturali e modalità per i relativi prelievi di campioni;

4. Circolare Regione Toscana 2.03.1994 n.1 - Disposizioni relative ai controlli igienico-sanitari sulla produzione e vendita delle acque minerali naturali.

I controlli microbiologici alla fonte devono essere effettuati almeno quattro volte l'anno, una per stagione; all'impianto di imbottigliamento, con periodicità settimanale, se la produzione giornaliera dello stabilimento supera i 500000 pezzi, quindicinale con produzione compresa tra i 200000 ed i 500000, mensile per produzioni inferiori ai 200000 pezzi; ai depositi di distribuzione sono previsti controlli analitici con frequenza mensile per acque minerali prodotte sul territorio Regionale e trimestrale per quelle prodotte fuori Regione. Per i punti di vendita, le frequenze di campionamento e le relative analisi sono regolate da programmi concordati in relazione al numero degli esercizi commerciali esistenti sul territorio di competenza, al fine di evitare ripetizioni di campioni uguali. Il trasporto dei campioni deve avvenire mediante contenitori coibentati e refrigerati in grado di assicurare il mantenimento della temperatura compresa tra 3 °C e 5 °C e le operazioni analitiche devono essere eseguite entro 12 ore dal prelievo.

PARAMETRI MICROBIOLOGICI	
COLIFORMI TOTALI	<i>in due repliche</i>
COLIFORMI FECALI	<i>in due repliche</i>
STREPTOCOCCHI FECALI	<i>in due repliche</i>
PSEUDOMONAS AERUGINOSA	
STAPHYLOCOCCUS AUREUS	
SPORE DI CLOSTRIDI SOLFITO RIDUTTORI	
CARICA MICROBICA TOTALE A 20 °C	
CARICA MICROBICA TOTALE A 37 °C	

Tabella 1 - Determinazioni microbiologiche: parametri

COLIFORMI TOTALI:	Filtrazione di due aliquote di 250 ml di acqua ciascuna su membrana di acetato di cellulosa (0,45 micron) <u>Terreno</u> Agar lattosato al tergitol 7 incubato a 36±1°C per 24 ore Prove di conferma
COLIFORMI FECALI:	Filtrazione di due aliquote di 250 ml di acqua ciascuna su membrana di acetato di cellulosa (0,45 micron) <u>Terreno</u> Agar lattosato al tergitol 7 + TTC incubato a 44 °C per 24 ore Prove di conferma
STREPTOCOCCHI FECALI:	Filtrazione di due aliquote di 250 ml di acqua ciascuna su membrana di acetato di cellulosa (0,45 micron) <u>Terreno</u> KF streptococcus agar incubato a 37 ± 1°C per 48 ore Prove di conferma
PSEUDOMONAS AERUGTNOSA:	Filtrazione di 250 ml di acqua su membrana di acetato di cellulosa(0,45micron) <u>Terreno</u> Agar alla cetrimide incubato a 36 ± 1°C per 48 ore Prove di conferma
STAPHYLOCOCCUS AUREUS:	Filtrazione di 250 ml di acqua su membrana di acetato di cellulosa (0,45 micron) <u>Terreno</u> Baird Parker incubato a 36 ± 1°C per 24 ore Prove di conferma
SPORE DI CLOSTRIDI SOLFITO-RIDUTTORI	Trattamento termico a 80 °C per 10 min Filtrazione di 50 ml di acqua su membrane di acetato di cellulosa (0,45 micron) <u>Terreno</u> SPS Agar incubato a 36 ± 1°C per 24 ore in anaerobiosi Prove di conferma
CARICA BATTERICA TOTALE	<u>Semina per inclusione</u> in Plate Count Agar di aliquote di 1 ml in piastre incubate a 37 °C e a 20 °C ,rispettivamente per 24 ore e per 72 ore

Tabella 2 - Determinazioni microbiologiche: metodi analitici

I parametri microbiologici da determinare, indicati negli articoli 9 e 10 del DM 12.11.1992 n.542 sono riportati nelle tabelle 1 e 2 assieme ai Metodi MF (Membrane Filtranti) da impiegare, per i dettagli dei quali si rimanda alla specifica Legislazione di riferimento (Circolare Ministero Sanità 13.09.1991 n.17 e DM 13.01.1993).

Può essere impiegato anche il metodo d'insemenza-mento in terreno liquido ma da diversi anni, il metodo delle Membrane Filtranti è di gran lunga il più usato. I terreni di coltura da impiegare per la determinazione dei Coliformi sono molto sensibili e poco specifici, di conseguenza sono necessarie, in caso di crescita microbica, prove di conferma che allungano inevitabilmente i tempi di risposta. Tuttavia, dato che raramente le acque minerali risultano inquinate, il problema diventa davvero marginale. Tra i parametri da determinare per il giudizio complessivo di qualità dell'acqua minerale non figura più l'Aeromonas, che il D.M.8.07.1997 disponeva di ricercare fino alla sua definitiva revoca, avvenuta con il successivo D.M. 27.11.1998. Dalle analisi microbiologiche effettuate sulle acque minerali, sia alla captazione che all'imbottigliamento, come ai depositi e alla vendita deve risultare l'assenza di: Coliformi totali e fecali, Streptococchi fecali, Spore di Clostridi solfito riduttori, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, come recita l'art. 9 del D.M 12.11.1992 n° 542. Il giudizio di NON ACCETTABILITA' in prima istanza sarà espresso in caso di positività in entrambe le repliche di Coliformi o Streptococchi, in caso di positività di Pseudomonas aeruginosa e Staphylococcus aureus. Saranno invece ripetute le analisi in caso di positività isolate di singole repliche (Coliformi o Streptococchi) e per positività di Clostridi solfito riduttori.

Riguardo alle cariche microbiche a 37 °C ed a 20 °C sono proposti valori di riferimento indicativi ma non concentrazioni massime ammissibili. Infatti non risulta possibile stabilire limiti rigidi per questi parametri, in quanto essi sono soggetti a notevoli variazioni determinate da diversi fattori, tra i quali la composizione stessa dell'acqua. Durante la fase di commercializzazione, se sono riscontrati valori di carica microbica superiori a quelli di riferimento (1000 UFC/ml per le acque addizionate di anidride carbonica e 10000 UFC/ml per quelle non addizionate, tabella 3) si provvederà ad effettuare ulteriori accertamenti, sia sul prodotto imbottigliato che alla fonte.

RISULTATI E DISCUSSIONE

I controlli microbiologici sono stati effettuati su campioni prelevati alla fonte, agli impianti d'imbottigliamento ed ai depositi degli stabilimenti di produzione delle Azien-

CARICA MICROBICA		
ALLA FONTE	5 UFC/ ml a 37°C	20 UFC/ ml a 20°C
ALL'IMBOTTIGLIAMENTO	20 UFC/ ml a 37°C	100 UFC/ ml a 20°C
ALLA VENDITA	≤ 10000 UFC/ ml	≤1000 UFC/ ml
	Senza CO ₂	Con CO ₂

Tabella 3 - Valori di riferimento per carica microbica

de presenti nella provincia di Firenze e Pisa; alcuni controlli occasionali hanno interessato anche Aziende situate in altre province della Toscana. Per le acque imbottigliate prelevate nei depositi della distribuzione ed alla vendita, i controlli sono stati eseguiti su campioni provenienti da Aziende collocate sull'intero territorio nazionale.

Sono stati analizzati anche campioni aperti presentati su denuncia di privati cittadini e consegnati ai Servizi di Igiene Pubblica o ai Carabinieri NAS. I controlli effettuati negli ultimi cinque anni, riassunti nella tabella 4, evidenziano su un totale di 223 acque minerali prelevate alla fonte ed agli impianti d'imbottigliamento, 9 (nove) campioni risultati inquinati da Pseudomonas aeruginosa, 8 dei quali, anche se riguardanti prelievi eseguiti in tempi diversi, riconducibili ad una stessa sorgente, con gravi problemi, mai peraltro risolti, tali da determinare la definitiva rinuncia allo sfruttamento.

Dei 267 campioni esaminati, prelevati ai depositi degli stabilimenti, della distribuzione ed alla vendita, 8 (otto) di essi sono risultati "NON ACCETTABILI", 1 (uno) per presenza di Pseudomonas aeruginosa, 7 (sette) per presenza di materiale terroso. Nel primo caso si è trattato di un'acqua minerale in vendita presso la grande distribuzione, prodotta fuori Regione, per la quale le analisi di seconda istanza non hanno poi confermato il giudizio di non accettabilità espresso in prima istanza. Nel caso dei sette campioni risultati contaminati da materiale terroso, tutti provenienti da una stessa Azienda produttrice toscana, e quindi da considerare di fatto un solo campione, si è trattato di un "anomalo risucchio di terra" nell'impianto, verificatosi in seguito alla riattivazione improvvisa del sistema di pompaggio dopo l'arresto determinatosi dalla sospensione di energia elettrica. Trattandosi di acqua contenuta in bottiglie in PET quasi trasparente, i corpi estranei risultavano, comunque, ben visibili. Per i 31 campioni aperti consegnati dai cittadini ai Servizi di Igiene Pubblica e /o ai Carabinieri del Nucleo Anti Sostituzioni (NAS), nella maggior parte dei casi (26 campioni), si è trattato di bottiglie in vetro o PET, in cui erano presenti corpi estranei di diversa natura, come muffe, alghe, materiale amorfo etc.; soltanto in 5 campioni è stata riscontrata la presenza di batteri "patogeni". Le indagini effettuate in seguito, sui prelievi ufficiali relativi a bottiglie appartenenti allo stesso lotto di pro-

Numero Campioni	Tipologia prelievo	Campioni accettabili	Campioni Non accettabili	Parametri
223	Alla fonte ed agli impianti di imbottigliamento	214 (96 %)	9 (2) (4 %) (0,9%)	Pseudomonas aeruginosa Staphylococcus aureus Coliformi
267	Ai depositi degli stabilimenti, della distribuzione ed alla vendita	259 (97 %)	1 7 (1) (3 %) (0,7%)	Pseudomonas aeruginosa Corpi estranei Funghi filamentosi
31	Campioni aperti	-----	5 (16,1%) 26 (83,9%)	Pseudomonas aeruginosa Staphylococcus aureus Coliformi Corpi estranei
Tot. 521				

Tabella 4 – Analisi microbiologiche acque minerali – Risultati controlli analitici periodo 1999-2003

duzione dei campioni aperti, quando trovate, non hanno confermato, con l'eccezione di un solo caso, le contaminazioni riscontrate su singola bottiglia, a dimostrazione che l'inquinamento di un'acqua minerale riguarda, più di sovente, bottiglie isolate o alcune di esse. I risultati dei controlli eseguiti nell'arco degli ultimi cinque anni dal Laboratorio di Biotossicologia, in accordo a quanto riscontrato nel quinquennio precedente, indicano che l'inquinamento di un'acqua minerale da parte dei batteri "indesiderati" è un'evenienza alquanto rara, ma pur sempre possibile.

CONCLUSIONI

Un'efficace sistema di controllo attuato dalle Aziende produttrici, anche di piccole dimensioni, in ottemperanza alle disposizioni legislative vigenti in materia, nonché la sorveglianza effettuata dagli organismi pubblici competenti, garantiscono un prodotto microbiologicamente sicuro. Purtroppo, l'acqua resta una matrice facilmente inquinabile, pertanto non sono concesse distrazioni o sospensive nell'applicazione di rigidi piani di autocontrollo. Ai Servizi di Igiene Pubblica compete la verifica dell'applicazione delle corrette procedure messe in atto per assicurare, alla fine del percorso produttivo, il mantenimento delle caratteristiche iniziali. Sicuramente il conseguimento dell'obiettivo di assicurazione della qualità non può essere disgiunto dalla necessità di mantenere alti i livelli di controllo e di vigilanza

BIBLIOGRAFIA

1. Autori vari - Atti del Meeting Internazionale sulle acque minerali naturali, Rivista italiana d'igiene. Nistri-Listri Editori, Pisa (1990).
2. ANEABE (Association National de Empresas de Aguas de Bebida Envasadas)- Actualisation des critères de qualité des eaux minérales naturelles. Madrid, 1991.
3. Autori vari - Atti del III Convegno di aggiornamento scientifico sulle acque minerali - N.3 luglio-settembre, Roma, La Rivista della Società Italiana di Scienza dell'Alimentazione, 1992.
4. **Tampo D.** - Tec&Doc-Lavoisier - Les eaux conditionnées. Parigi (1992)
5. **Ravazzoni R.** - Profili di sviluppo di un settore: l'industria italiana delle acque minerali negli anni '80. Giuffrè Editore, Milano, 1993.
6. Autori vari - Legislazione, controllo di qualità e produzione, Atti 1° Congresso Internazionale Acque Minerali e Soft Drinks Firenze(1996). Pacini Editore, Ospedaletto Pisa, 1997.
7. **De Fusco R., Biscardi D., Zampoli L.** - Valutazione dei parametri microbiologici delle acque minerali imbottigliate in Italia- Ann. Ig.10, 45-53 - 1998
8. **Ferri M. A.** - L'evoluzione del settore delle acque minerali- Aspetti di produzione e di commercializzazione. Edizioni CEDAM, Padova, 1999.
9. Annuario delle acque minerali italiane - Edizioni Laus, Milano(89/90,91/92,93/94,95/96,97/98,99/00)
10. **Zanasi A., Brazzorotto C.** - Guida delle acque minerali in bottiglia GM Servizi, IV edizione, luglio 2000.
11. **Calà P.G.** - Studio della migrazione di sostanze costituenti il contenitore di polietilentereftalato nel confezionamento di alcune acque minerali della Toscana - Tesi di Laurea, Firenze, Corso di Laurea in Farmacia, A.A1999/00.
12. **Fiorentino G. P., Mantelli F.** - Principali cause di alterazione dei requisiti di qualità delle acque minerali naturali. Boll.Chim.Igien.Vol.52, pp 45.53, 2001.
13. **Temporelli G.** - Le acque minerali, Ranieri Editore Milano 2002
14. **Calà P.G., Mantelli F.** - Le acque minerali naturali: principali caratteristiche, tecniche d'analisi, legislazione in: Regione Toscana - Quaderni di Igiene pubblica e veterinaria n° 16 Settembre 2003