

INDAGINE PRELIMINARE SULLA QUALITÀ BATTERIOLOGICA DI ACQUA MICROFILTRATA IN STRUTTURE DELLA RISTORAZIONE COLLETTIVA

PRELIMINARY INVESTIGATION ON THE BACTERIOLOGICAL QUALITY OF MICROFILTERED DRINKING WATER DISPENSERS IN CATERING ESTABLISHMENTS

Marzano M.A., Balzaretto C.M.

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Veterinarie per la Sicurezza Alimentare – Facoltà di Medicina Veterinaria - Università degli Studi di Milano

SUMMARY

The bacteriological quality of microfiltered drinking water dispensers was evaluated, through enumeration of heterotrophic plate count at 22 and 37 °C, total coliforms, *Escherichia coli*, *Enterococcus* spp. and *Pseudomonas aeruginosa*. The aim of this research was to control the hygiene of the microfiltered water and to evaluate the effectiveness of the microfiltration procedure on the survival of bacteria. In total, 54 water samples were analyzed. The results indicated a high contamination frequency with *P. aeruginosa* (25 and 20% in room temperature and chilled water samples, respectively) and therefore the need to improve the efficacy and the frequency of the dispenser sanitation procedures.

KEYWORDS

water dispensers; *Pseudomonas aeruginosa*; microfiltered drinking water; catering

INTRODUZIONE

I distributori di acqua microfiltrata sono offerti come un'alternativa all'acqua minerale in bottiglia ed il loro numero sta crescendo negli ultimi anni sia nelle residenze private sia nei luoghi pubblici (uffici, ristoranti, mense, ospedali). L'utilizzo di questi dispositivi rende possibile l'eliminazione di alcuni inconvenienti, logistici e di impatto ambientale, associati con l'acqua in bottiglia quali il trasporto, il deposito e lo smaltimento delle bottiglie di plastica.

I sistemi automatizzati self-service di acqua microfiltrata sono collegati direttamente alla rete idrica e possono erogare acqua naturale o gasata, a temperatura ambiente o refrigerata. Il trattamento microfiltrante è effettuato immediatamente prima che l'acqua sia erogata. In commercio esistono molteplici sistemi di filtrazione, i più comuni sono costituiti da carbone attivo in polvere piuttosto che in scaglie o estruso, che esercita una filtrazione fisica: l'acqua entra all'interno del sistema filtrante con un

moto turbolento così che la massa filtrante viene fatta fluttuare insieme all'acqua. Prima dell'uscita, l'acqua viene separata dal materiale filtrante mediante una membrana a soffietto in fibre di polietilene calandrate a caldo con una capacità filtrante inferiore a 0,5 µm. Sovente i filtri semplici a carbone attivo sono arricchiti con sostanze ad azione battericida/batteriostatica come ioni argento, oppure sono associati a lampade UV. Tuttavia queste attrezzature possono essere responsabili di problemi in materia di igiene e salute pubblica qualora la manutenzione ordinaria e straordinaria si rivelino inadeguate oppure a causa di un decremento dell'uso, con lunghi periodi di inutilizzo. È ben risaputo che, nei dispositivi in cui il flusso dell'acqua è rallentato in una rete di tubi, i batteri possono formare biofilm multi-specie adesi all'interno delle tubature (2). Il biofilm può rappresentare l'origine di livelli indesiderabili di patogeni opportunisti come *Pseudomonas aeruginosa*, il quale è in grado di produrre lui stesso i biofilm. *P. aeruginosa* è un

batterio gram negativo, comunemente presente nelle acque. Questo microrganismo ha esigenze nutrizionali molto semplici, inoltre è molto resistente ai trattamenti disinfettanti comunemente usati con l'acqua potabile e per questo motivo può facilmente raggiungere cariche così elevate da costituire un rischio per la salute umana, soprattutto in soggetti severamente immunodepressi e debilitati, oppure vulnerabili per caratteristiche proprie dell'età come i bambini ed i soggetti anziani. La terapia delle infezioni causate da *P. aeruginosa* è molto problematica, in quanto questi batteri sono frequentemente resistenti a numerosi antibiotici ad ampio spettro (3). L'utilizzo dei filtri a carbone attivo nelle macchine microfiltranti collegate alla rete idrica può amplificare il numero dei batteri presenti nell'acqua potabile, specialmente durante i periodi di ristagno (4). Fino ad oggi pochi studi sono stati pubblicati sulla qualità batteriologica di acqua erogata dai dispenser (5, 6, 7). Questi studi hanno riportato un aumento della contaminazione dell'acqua microfiltrata erogata confrontata con quella di rete.

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di valutare la qualità microbiologica di acqua microfiltrata erogata da dispenser dotati di filtri a carbone attivo, ubicati in strutture della ristorazione collettiva aziendale in una grande città del Nord Italia, mediante la determinazione del conteggio delle colonie a 22 e 37 °C, dei coliformi totali, *Escherichia coli*, *P. aeruginosa* ed enterococchi intestinali.

MATERIALI E METODI

In totale sono stati analizzati 54 campioni di acqua naturale ($n = 24$ a temperatura ambiente e $n = 30$ refrigerata) prelevati da 18 punti di prelievo ubicati in 4 sale mensa della ristorazione collettiva aziendale. I campioni sono stati prelevati dai rubinetti dei dispenser precedentemente disinfettati esternamente ed internamente con una soluzione di etanolo al 70%. Prima del campionamento, l'acqua è stata lasciata fluire per circa 2 minuti. Ogni campione consisteva in circa 1 L di acqua, immesso in un contenitore sterile di plastica contenente 10 mg di sodio tiosolfato (Flacone Tio-Square, International PBI SpA). I campioni sono stati trasportati in laboratorio in contenitori refrigerati ed analizzati immediatamente all'arrivo.

Le analisi microbiologiche sono state effettuate mediante la tecnica della filtrazione su membrana, in accordo con i protocolli dell'International Standards Organization (ISO), per la determinazione dei coliformi totali (CT) (8); *Escherichia coli* (EC) (8); *P. aeruginosa*

(PA), (11); *Enterococcus* spp. (EN) (9); conteggio delle colonie (CC) a 22 e 37 °C, (10). I campioni di acqua, di 100 o 250 ml ciascuno, sono stati filtrati attraverso una membrana idrofila sterile di estere di cellulosa (International PBI SpA) di 0.45 µm di porosità e 47 mm di diametro per tutti i microrganismi, e le membrane sono state posizionate su piastre di Petri contenenti i terreni di coltura specifici: Tergitol TTC (Oxoid Corporation) per i coliformi totali ed *E. coli*; Pseudomonas Agar Base/CN-Agar (Oxoid Corporation) per *P. aeruginosa*; Slanetz e Bartley (Oxoid Corporation) per *Enterococcus* spp. Per il conteggio delle colonie di microrganismi vitali è stato utilizzato il metodo di semina per inclusione, nel quale ogni piastra di Petri sterile è stata riempita con 1 ml di campione di acqua, al quale sono stati aggiunti dai 15 ai 20 ml di Water Plate Count Agar (Oxoid Corporation). Le piastre sono state incubate a 37 °C per 24 h, a 42 °C per 24 h, a 37 °C per 48 h, a 37 °C per 24 h ed a 22-37 °C per 24-72 h, per ogni terreno, rispettivamente.

Per quanto riguarda *P. aeruginosa*, la presenza del microrganismo è stata confermata usando il test dell'ossidasi, il test della fluorescenza e semina su piastra contenente cetrimide agar, incubata per 24 h a 42 °C. La presenza di *Enterococcus* spp. è stata confermata mediante trasferimento della membrana con pinze sterili su piastra di agar contenente bile, esculina ed azide preriscaldata a 44°C, incubata a 44°C per 2 h. La presenza di *E. coli* è stata confermata mediante verifica dell'assenza dell'enzima citocromo-ossidasi e della produzione di indolo.

I risultati sono stati interpretati in accordo alla vigente normativa per le acque destinate ad uso umano confezionate in bottiglia o contenitori (Decreto legislativo 31/2001, in accordo con la Direttiva CEE 98/83 (12)), che stabilisce che *E. coli*, *Enterococcus* spp., *P. aeruginosa* devono essere assenti in 250 ml di acqua ed i coliformi totali in 100 ml, mentre il conteggio delle colonie a 22 ° e 37 °C, non deve superare 100 UFC/ml e 20 UFC/ml, rispettivamente.

RISULTATI

Le caratteristiche microbiologiche dei campioni analizzati sono illustrate nelle tabelle 1 e 2. La media geometrica (Tab. 2), così come la deviazione standard, ed i valori minimi e massimi, sono stati calcolati considerando i soli campioni positivi (sono stati definiti negativi i campioni con conteggio colonie a 22 e 37°C = 0 UFC/ml; coliformi totali = 0 UFC/100ml; *Escherichia coli*, *Enterococcus* spp., *Pseudomonas aeruginosa* = 0 UFC/250ml).

Tabella 1: percentuali di conformità agli standard microbiologici^a.

Campioni	Giudizio	Percentuali di conformità/non conformità						
		CC a 37 °C	CC a 22 °C	CT	EC	EN	PA	Totale
Acqua microfiltrata a temperatura ambiente n: 24	Conforme	37.5	37.5	25.0	100.0	87.5	75.0	12.5
	Non conforme	62.5	62.5	75.0	0.0	12.5	25.0	87.5 ^b
Acqua microfiltrata refrigerata n: 30	Conforme	50.0	80.0	30.0	90.0	100.0	80.0	20.0
	Non conforme	50.0	20.0	70.0	10.0	0.0	20.0	80.0 ^b

CC: conteggio delle colonie a 22 e 37 °C, CT: coliformi totali, EC: *Escherichia coli*, EN: *Enterococcus* spp., PA: *Pseudomonas aeruginosa*.

^a CC a 37°C non deve essere superiore a 20 UFC/mL, CC a 22°C non deve essere superiore a 100 UFC/mL, CT non devono essere rilevati in 100 ml, EC, EN e PA non devono essere ritrovati in 250 ml.

^b La percentuale totale non conformità è stata calcolata considerando i campioni che sono risultati non conformi ai limiti di legge per almeno un parametro microbiologico.

Tabella 2: incidenza e livelli batteriologici sui campioni di acqua microfiltrata.

Campioni	Test batteriologici	Numero di campioni positivi ^a (%) ^b	Media Geometrica (log ₁₀ UFC/ml/100 ml/250ml)	Deviazione Standard (log ₁₀ UFC/ml/100 ml/250ml)	Valore minimo (log ₁₀ UFC/ml/100ml/250 ml)	Valore massimo (log ₁₀ UFC/ml/100ml/250 ml)
Acqua microfiltrata a temperatura ambiente n: 24	CC a 37°C (UFC/ml)	24 (100.0)	1.59	0.74	0.30	2.57
	CC a 22°C (UFC/ml)	24 (100.0)	1.96	0.64	1.08	2.65
	CT (UFC/100 ml)	18 (75.0)	1.33	0.90	0.30	2.48
	EC (UFC/250 ml)	0 (0.0)	-	-	-	-
	EN (UFC/250 ml)	3 (12.5)	0.36	0.10	0.30	0.48
	PA (UFC/250 ml)	6 (25.0)	1.59	0.37	1.20	1.94
Acqua microfiltrata refrigerata n: 30	CC a 37°C (UFC/ml)	30 (100.0)	1.27	0.62	0.30	2.37
	CC a 22°C (UFC/ml)	30 (100.0)	1.36	0.57	0.48	2.32
	CT (UFC/100 ml)	21 (70.0)	1.25	0.63	0.48	2.48
	EC (UFC/250 ml)	3 (10.0)	1.14	0.06	1.08	1.20
	EN (UFC/250 ml)	0 (0.0)	-	-	-	-
	PA (UFC/250 ml)	6 (20.0)	0.33	0.07	0.30	0.48

UFC: unità formanti colonia, CC: conteggio colonie di microrganismi vitali, CT: coliformi totali, EC: *Escherichia coli*, EN: *Enterococcus* spp., PA: *Pseudomonas aeruginosa*.

^a Sono stati considerati negativi i campioni con CC = 0 UFC/ml; CT = 0 UFC/100 ml; EC, EN, PA = 0 UFC/250 ml.

^b I valori nelle parentesi si riferiscono alle percentuali di campioni positivi.

CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

L'acqua microfiltrata analizzata in questo studio è risultata essere inappropriata per il con-

sumo umano ai sensi della normativa vigente, nella misura dell'87.5% dei campioni di acqua temperatura ambiente e dell'80% di quelli a temperatura refrigerata. Queste percentuali sono state calcolate considerando tutti i cam-

pioni con almeno un parametro microbiologico eccedente i limiti di legge. La differenza tra i livelli di contaminazione misurati nei campioni di acqua a temperatura ambiente ed in quelli di acqua refrigerata è risultata statisticamente significativa ($p < 0.05$) per il conteggio delle colonie a 37 e 22 °C e per *P. aeruginosa*. La refrigerazione ha dunque dimostrato nel nostro studio un effetto inibente la crescita di queste due categorie batteriologiche. Non è stata rilevata una differenza statisticamente significativa tra acqua fredda ed a temperatura ambiente per quanto riguarda la contaminazione da coliformi totali, *E. coli* e *P. aeruginosa*.

Il risultato più rilevante (Tab. 1) è l'alta frequenza di contaminazione dell'acqua da parte di *P. aeruginosa* (25% e 20%, rispettivamente nei campioni a temperatura ambiente e refrigerata). Questo dato risulta di grande interesse se confrontato con i risultati ottenuti su campioni di acqua di rete da altri autori, quali ad esempio Liguori (13) nel 2010, che riportò il 3.3% dei campioni di acqua di rete positivi per *P. aeruginosa*, e Papapetropoulou (14) in Grecia che riportò il 9% dei campioni di acqua di rubinetto contaminata da questo microrganismo. I nostri risultati confermano l'ipotesi che la stagnazione dell'acqua seppur trattata all'origine, quale è l'acqua di rete, all'interno dei sistemi di microfiltrazione, può causare l'aumento dei livelli batterici. Siccome il ruolo di *P. aeruginosa* in malattie causate da acqua contaminata è stato ben descritto (15), i risultati ottenuti richiedono la massima attenzione da parte di tutti gli operatori del settore alimentare e di tutti gli organismi di vigilanza.

Lo studio e la messa in atto di procedure sanificanti più efficaci e più frequenti a carico di queste apparecchiature filtranti è di peculiare importanza non solo per ridurre il rischio microbiologico associato al consumo di questa tipologia idrica nei luoghi pubblici, quali le strutture della ristorazione oggetto di questo studio, ma anche per tutelare i luoghi più vulnerabili dal punto di vista della salute umana, come i luoghi privati, i quali non sono protetti dalla vigilanza permanente sanitaria.

BIBLIOGRAFIA

- Zanetti F., De Luca G., Sacchetti R. (2009). Control of bacterial contamination in microfiltered water dispensers (MWDs) by disinfection. *International Journal of Food Microbiology*, 128, 446-452.
- Szymanska J. (2005). Electron microscopic examination of dental unit waterlines biofilm. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 12, 295-298.
- Sacchetti R., De Luca G., Zanetti F. (2009). Control of *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia* contamination of microfiltered water dispensers with peracetic acid and hydrogen peroxide. *International Journal of Food Microbiology*, 132, 162-166.
- Chaidez C., Gerba C. (2004). Comparison of the microbiological quality of point-of-use (POU)-treated water and tap water. *International Journal of Environmental Health Research*, 14, 253-260.
- Levesque B., Simard P., Gauvin D., Gingras S., Dewailly E., Letarte R. (1994). Comparison of the microbiological quality of water coolers and that of municipal water systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 60 (4), 1174-1178.
- Baumgartner A., Grand M. (2006). Bacteriological quality of drinking water from dispensers (coolers) and possible control measures. *Journal of food protection*, vol. 69, No 12, 3043-3046.
- Marzano M.A., Ripamonti B., Balzaretto C.M. (2011). Monitoring the bacteriological quality of Italian bottled spring water from dispensers. *Food Control*, 2, 333-336.
- International Organization for Standardization (ISO) 9308-1:2002 (2002). *Water quality – detection and enumeration of Escherichia coli and coliform bacteria – Part 1: Membrane filtration method*, Geneva: International Organization for Standardization.
- International Organization for Standardization (ISO) 7899-2:2003 (2003). *Water quality – Detection and enumeration of intestinal enterococci – Part 2: Membrane filtration method*, Geneva: International Organization for Standardization.
- International Organization for Standardization (ISO) 6222:2001 (2001). *Water quality – Enumeration of culturable micro-organisms – Colony count by inoculation in a nutrient agar culture medium*, Geneva: International Organization for Standardization.
- International Organization for Standardization (ISO) 16266:2008 (2008). *Water quality – Detection and enumeration of Pseudomonas aeruginosa – Method by membrane filtration*, Geneva: International Organization for Standardization.
- Direttiva della Comunità Economica Europea 98/83/CEE (1998). Sulla qualità dell'acqua destinata ad uso umano. Il Consiglio della Comunità Europea. (OJ No. L330, 5.12.1998).
- Liguori G., Cavallotti I., Arnese A., Amiranda C., Anastasi D., Angelillo I.F. (2010). Microbiological quality of drinking water from dispensers in Italy. *BMC Microbiology*,

- 10:19. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/10/19>.
14. Papapetropoulou M., Iliopoulou J., Rodopoulou G., Detorakis J., Paniara O. (1994). Occurrence and antibiotic-resistance of *Pseudomonas* species isolated from drinking water in Southern Greece. *Journal of Chemotherapy*, 6(2), 111-116.
15. Naze F., Jouen E., Randriamahazo R.T., Simac C., Laurent P., Blériot A., Chiroleu F., Gagnevin L., Pruvost O., Michault A. (2010). *Pseudomonas aeruginosa* out break linked to mineral water bottles in a neonatal intensive care unit: fast typing by use of high-resolution melting analysis of a variable-number tandem-repeat locus. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(9), 3146-3152.