

PROBLEMATICA DE LA REGLAMENTACION TECNICO-SANITARIA DE LAS AGUAS DE BEBIDA ENVASADA EN SUS ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS

1. Introducción

2. Definiciones

3. Condiciones de las industrias, personal, materiales, envasado y comercialización

3.1. Controles

3.2. Manipulaciones

3.3. Características microbiológicas y parasitológicas de las aguas minerales naturales

4. Por último el reglamento vuelve a insistir que:

5. Métodos de análisis y toma de muestras

6. Conclusiones

PROBLEMATICA DE LA REGLAMENTACION TECNICO-SANITARIA DE LAS AGUAS DE BEBIDA ENVASADAS EN SUS ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS.

M^a del Carmen de la Rosa Jorge
Dpto. de Microbiología II. Facultad de Farmacia
Universidad Complutense.Madrid.

1. INTRODUCCIÓN

Recientemente, mediante Real Decreto de 22 de julio de 1991 se ha aprobado una nueva Reglamentación Técnico Sanitaria para la elaboración, circulación y comercio de aguas de bebida envasadas. Dicho Real Decreto fue publicado en el Boletín Oficial del Estado del 26 de Julio de 1991 (Año. 1991) y a su entrada en vigor quedaban derogadas las anteriores regulaciones específicas incluida la Reglamentación Técnico-Sanitaria de 24 de julio de 1981 (Año. 1981). Según se indica en dicho Real Decreto esta nueva Reglamentación ha sido necesaria para adecuar la normativa nacional a la de las Comunidades Europeas sobre explotación y comercialización de las aguas minerales naturales establecida por la Directiva del Consejo 80/777/CEE, de 15 de julio (Año. 1980).

La Reglamentación consta de:

- Título Preliminar. En el que se indica el ámbito de aplicación y se definen los distintos tipos de agua y otros conceptos.
- Título Primero. Trata de las exigencias generales obligatorias para los tipos de aguas definidos en el que se incluyen: condiciones de las industrias, personal y materiales, el envasado y comercialización, los controles y las responsabilidades, competencias, infracciones y sanciones.
- Título Segundo. Determina los requisitos específicos obligatorios para cada tipo de agua, incluyendo: especificaciones que deben cumplir, manipulaciones permitidas y prohibidas, el etiquetado y la publicidad.

Además se incluyen tres Anexos con los siguientes contenidos:

- Anexo I. Características exigidas a los diferentes tipos de aguas: generales, organolépticas, microbiológicas, parasitológicas y químicas.
- Anexo II. Normas y criterios para efectuar los reconocimientos del derecho a la utilización de las denominaciones en el que se incluyen estudios : geológico, hidrológico, físico, químico, microbiológico, farmacológico, fisiológico y clínico.
- Anexo III. Exigencias específicas del etiquetado

En esta Ponencia vamos a referirnos solamente a los aspectos microbiológicos de dicha Reglamentación poniendo de manifiesto los diversos problemas que supone su estricto cumplimiento.

2. Definiciones

En el Capítulo II del Título Preliminar se definen los distintos tipos de aguas de bebida envasadas en las que se incluyen: aguas minerales naturales, aguas de manantial, aguas preparadas y aguas de consumo público envasadas.

Se observa que desaparece la anterior denominación de aguas mineromedicinales teniendo que optar a la calificación de las mismas dentro de los otros tipos de agua.

Las **aguas minerales naturales** se definen como: "aquellas bacteriológicamente sanas que tengan su origen en un estrato o yacimiento subterráneo y que broten de un manantial en uno o varios puntos de alumbramiento naturales o perforados".

La definición es una copia exacta de la de la Directiva de la CEE con la excepción de la palabra sana por pura. Esta definición la considero ambigua. ¿Qué significa que un agua es bacteriológicamente sana? ¿Qué no tiene bacterias patógenas o que no tiene ninguna bacteria?. Además al indicar expresamente bacteriológica, deja fuera otros tipos de microorganismos: hongos, virus, protozoos, que también pueden ser peligrosos para la salud. Creo, por tanto, que la definición de la anterior Reglamentación expresaba mucho mejor las características de este tipo de aguas.

Las **aguas de manantial** se definen igual que en la Reglamentación anterior como: "Son las potables de origen subterráneo... con las características naturales de pureza que permiten su consumo...".

Desde un punto de vista microbiológico es una definición más clara ya que especifica que deben ser potables.

3. Condiciones de las industrias, personal, materiales, envasado y comercialización.

Las industrias envasadoras deben utilizar buenas prácticas de fabricación así como promover todas las medidas preventivas necesarias para evitar posibles contaminaciones o alteración de las características bacteriológicas y químicas de las aguas.

En los distintos artículos del Título Primero se especifican los requisitos higiénicos que deben cumplir los distintos puntos críticos desde el punto de captación del agua hasta que llega al consumidor.

3.1. Controles

En el Artículo 12.1 que trata de la naturaleza, periodicidad e incidencia de los autocontroles se especifica que:

1. "Al menos cada 5 años se realizará del agua del punto de emergencia un análisis completo físico químico y de los posibles contaminantes". Se supone que se incluyen los contaminantes microbianos aunque no lo especifique.

2.-"Al menos trimestralmente se realizarán en el agua todas las determinaciones microbiológicas previstas en esta Reglamentación". Al referirse al agua no está claro si es en el punto de emergencia o en el agua envasada. Podría ser el punto de emergencia ya que el agua envasada se analiza en cada lote.

3.-"En cada jornada laboral se realizarán análisis sobre muestras de producto terminado de los parámetros indicadores de contaminación microbiológica". ¿Estos parámetros son todos los previstos en esta Reglamentación o sólo los indicadores de contaminación fecal?.

Esta falta de claridad supone un problema serio ya que el incumplimiento de estas prescripciones se califican como infracciones sanitarias graves o muy graves y están sometidas a un régimen sancionador.

3.2. Manipulaciones

En las aguas minerales naturales y de manantial se prohíbe la adición de productos o la utilización de tratamientos que desinfecten o modifiquen el contenido microbiano. Por lo que sólo se permite la oxigenación, decantación y filtración para la separación de elementos inestables. En esta Reglamentación se supone que no se permite el tratamiento por radiación ultravioleta, que estaba permitido en la anterior Reglamentación (Año. 1981).

En las aguas preparadas si se pueden efectuar tratamientos fisico-químicos incluidos cloración y ozonización aunque modifiquen la composición química del agua.

3.3. Características microbiológicas y parasitológicas de las aguas minerales naturales.

Las características microbiológicas descritas en el Anexo I que deben cumplir estas aguas son exactamente iguales a las que se indican en la Directiva de la CEE (Año. 1980).

1.- "**En los puntos de alumbramiento** el contenido total de microorganismos revivificables deberá ajustarse a su microbismo normal. A título orientativo no debería normalmente superar:

20 colonias por ml después de incubación a 20°C-22°C, 72 horas

5 colonias por ml después de incubación a 37°C, 24 horas".

En este punto hay varios aspectos confusos que sería conveniente aclarar. Dice el texto que el número total de microorganismos debe ajustarse a su "microbismo normal", término que se define previamente como "la flora bacteriana perceptiblemente constante existente en el manantial con anterioridad a cualquier manipulación y cuya composición cualitativa y cuantitativa sea controlada periódicamente".

Observese que el "microbismo" se refiere sólo a las bacterias, debiéndose conocer no sólo el nº sino los géneros y especies presentes en el manantial en distintos periodos de tiempo. Este término que ya fué utilizado por Dalabroise y Ducluzeau en 1974, debería sustituirse por el de micropoblación autóctona. Efectivamente considero este estudio muy interesante y necesario para conocer los microorganismos autóctonos propios de cada agua. Sin embargo, la normativa no indica la forma de realizarlo: métodos, medios

de cultivo, nº de muestras. En cuanto a la periodicidad solamente la concreta para reconocer el derecho a la utilización de un tipo de agua, debiendo realizarse análisis microbiológicos cada uno de los doce meses precedentes a la solicitud (Anexo II, 1.3). En el caso de industrias ya establecidas no está claro si este estudio debe realizarse cada 3 meses o cada 5 años según se indica en el artículo 12.1 relativo a los autocontroles.

El otro aspecto, a mi modo de ver, problemático es el relativo al nº de microorganismos, ya que se dan unas cifras orientativas, es decir no obligatorias, que sólo sirven para aumentar la confusión. Por otro lado estos recuentos son demasiado bajos y, aunque la micropoblación heterótrofa en los manantiales suele ser pequeña, por su escaso contenido en nutrientes, en nuestra experiencia muchos manantiales minerales españoles las superan. Además es muy importante el método y medio de cultivo utilizados para el recuento y esta normativa no especifica cuales deben emplearse por lo que los resultados obtenidos con distintos métodos y medios no son comparables.

Estudios realizados por diversos autores en manantiales minerales españoles cuya agua es envasada han obtenido recuentos medios de bacterias heterótrofas a 22°C de: 1-50 (Quevedo et al. 1986); 10-100 (Moro y de la Rosa, 1987); 100-1000 (Gonzalez et al. 1987) y a 37°C de: 2-50 (Moro y de la Rosa, 1987) y 10-1000 (Mosso et al., 1985), observandose ligeras variaciones estacionales.

En diversos estudios realizados por nosotros en manantiales de aguas mineromedicinales que se emplean para tratamientos en Balnearios, también hemos encontrado recuentos de bacterias heterótrofas superiores a los recomendados por esta Reglamentación tanto a 22°C como a 37°C, incluso superiores a 1000 por ml (de la Rosa et al. 1987; Mosso et al. 1988). Aunque este tipo de manantiales están excluidos explícitamente de esta Reglamentación ya que sus aguas no se envasan, sin embargo pueden ser indicativos de que la micropoblación de las aguas minerales no es tan pequeña, al menos en nuestro país, como algunos autores han encontrado en los suyos (Buttiaux, 1960; Schmidt-Lorenz, 1976). Unos factores que influyen notablemente en el tipo de micropoblación mayoritaria son la temperatura de emergencia y las características físicoquímicas del agua. Así en manantiales termales es frecuente que las bacterias a 37°C superen a las de 22°C (de la Rosa et al. 1987, 1989, 1991; Mosso et al. 1988). No es correcto, por tanto, generalizar diciendo que todas las bacterias de aguas minerales naturales son psicrótrofas, por lo que no puede utilizarse el recuento a 37°C como indicador de contaminación de bacterias patógenas, lo que ya fué demostrado por Schwaller y Schmidt-Lorenz en 1982 en un estudio con aguas embotelladas francesas y suizas. Por otro lado cuando el pH del agua es ácido el nº de bacterias es muy bajo (Quevedo et al. 1986; Mosso 1990).

Además no debemos olvidar que todos estos estudios se refieren sólo a microorganismos revivificables y, por supuesto, heterótrofos ya que los detectamos en medios de cultivo con fuentes de carbono, pero la micropoblación total es mucho mayor. En estudios realizados por nosotros haciendo el recuento total de microorganismos por el método de epifluorescencia hemos encontrado cifras superiores en tres a cuatro unidades logarítmicas a las del recuento en placa. La mayoría de ellas están vivas pero metabólicamente inactivas (Mosso et al. 1990) lo que es frecuente en aguas pobres en nutrientes donde se encuentran en estado latente y no se multiplican (Tabor y Neihof, 1982; Oger et al. 1987).

2.- "En **el envase**, antes de las 12 horas del envasado y manteniéndolo entre 1-4°C, los microorganismos revivificables no deben sobrepasar:

100 ufc/ml incubados a 20-22°C, durante 72 horas

20 ufc/ml incubados a 37°C, 24 horas".

En este caso se indica que el medio de cultivo empleado puede ser agar o agar-gelatina en placas, pero no especifica el método que debe utilizarse porque tanto en el método de dilución en masa, extensión en superficie y filtración se emplean placas con medio de cultivo.

Mención aparte merece el comentario sobre el medio de cultivo, supongo que cuando indica agar se referirá a un agar nutritivo, pero la composición puede ser muy variable y, como ya hemos indicado, los resultados no son comparables si se utilizan medios distintos. En cuanto a la mezcla agar-gelatina, dejó de utilizarse hace muchos años por sus inconvenientes.

En relación con el límite microbiológico parece que deben cumplirlo sólo el agua recién envasada y mantenida a baja temperatura. En estas condiciones y siempre que el punto de emergencia tenga niveles de bacterias más bajos, podrían llegar a cumplirse estos límites (González *et al.* 1987; Morais y Da Costa, 1990). No comprendo porque deben de cumplirse en las aguas recién envasadas cuando no es necesario hacerlo una vez comercializada y, por tanto, en el momento de consumirse.

3.- "Tanto en **los puntos de alumbramiento** como durante **la comercialización** un agua mineral natural debe estar exenta de:

- a) Parásitos y microorganismos patógenos.
- b) Escherichia coli y otros coliformes y de estreptococos fecales en 250 ml.
- c) Clostridios sulfito reductores en 50 ml.
- d) Pseudomonas aeruginosa en 250 ml".

Con relación a estas exigencias parece obvio que cualquier agua que vaya a ser consumida no debe tener microorganismos patógenos ni indicadores de contaminación fecal. Sin embargo, con fines prácticos, no es adecuado que se exija la demostración de la ausencia de microorganismos patógenos sin especificar cuales, ya que, sería inviable estudiarlos todos y por eso tradicionalmente lo que se investiga son los indicadores fecales. Por tanto, si se requiere ausencia de indicadores fecales para evitar el riesgo de que se encuentren patógenos fecales, parece un contrasentido tener que investigar éstos también. Creo que no es correcto pedir en una Reglamentación la ausencia de microorganismos patógenos sino se especifica cuales deben investigarse y en qué cantidad de muestra.

Esta polémica no es nueva, ni mucho menos, porque ya Buttiaux en 1960 y refiriéndose a un trabajo anterior con Mossel dice a propósito de normas bacteriológicas: "... No se dirá nunca ausencia de gérmenes patógenos sin especificar en qué cantidad de producto su investigación es posible o útil". Y posteriormente Mossel en 1982 indica como primera regla para elegir microorganismos indicadores que sean los mínimos indispensables. Parece, por tanto, que no hemos adelantado nada en todos estos años, sino más bien al contrario, pues esta Reglamentación es, en estos aspectos, un paso atrás en relación a la de 1981. En ésta se exigía ausencia en 100 ml de Salmonella y Staphylococcus aureus. Es decir, especificaba los microorganismos patógenos que debían investigarse y en qué cantidad.

Otro aspecto que quería comentar es la investigación de los **indicadores fecales**. Aquí, otra vez, el Reglamento nuevo supone un retroceso con respecto al anterior ya que incluye a los coliformes totales en sus requisitos de ausencia, cuando está actualmente demostrado que este tipo de Enterobacterias no es indicativo de contaminación fecal, ya que muchas de sus especies tienen su hábitat normal en el agua y suelo (Leclerc y Mossel, 1989). Solamente los coliformes termotolerantes que crecen a 44,5°C y, específicamente, E. coli son indicadores fecales significativos.

En cuanto a la exigencia de ausencia en 250 ml de ***Pseudomonas aeruginosa*** ha sido ampliamente debatido y no creo necesario insistir. Está totalmente justificado por ser un patógeno oportunista causante de infecciones graves, resistente a los antibióticos y desinfectantes y que, por su supervivencia y fácil multiplicación en aguas con pocos nutrientes puede distribuirse ampliamente con riesgo para la salud sobre todo en ambientes clínicos (Schmidt-Lorenz, 1976). Sin embargo aunque algunas cepas producen enterotoxinas no se ha demostrado claramente su asociación con toxiinfecciones alimentarias o gastroenteritis de origen hídrico, salvo en un caso (Veron, 1989).

4.- POR ÚLTIMO EL REGLAMENTO VUELVE A INSISTIR EN QUE:

"El contenido total de microorganismos revivificables del agua mineral sólo podrá resultar de la evolución normal del contenido de gérmenes que tuviera en los puntos de alumbramiento"

¿Qué significa **evolución normal**? ¿Qué aumentan o que disminuyen?

Está claramente demostrado que las bacterias heterótrofas se multiplican naturalmente en las aguas minerales y que a los pocos días del embotellado alcanzan recuentos de 10^4 - 10^6 ufc/ml (Buttiaux y Boudier, 1960; Warburton *et al.* 1986; González *et al.* 1987; Manaia *et al.* 1990; Morais y Da Costa, 1990; Leclerc, 1991). Por tanto, parece obvio que no debe exigirse un límite de bacterias viables en las aguas embotelladas y almacenadas. Sin embargo para conocer la evolución de los microorganismos presentes en el manantial deberían realizarse estudios tanto cualitativos como cuantitativos de las poblaciones bacterianas a lo largo de todo el período de consumo. Ya que como indican Morais y Da Costa, los cambios que se producen en las micropoblaciones pueden deberse a cambios en los nutrientes disponibles, pérdida de viabilidad de algunas cepas, competición o antagonismo entre ellas. Sin embargo creo que estos estudios son difíciles de realizar en la práctica por ser largos, muy laboriosos y de gran especialización.

5. Métodos de análisis y toma de muestras

"Para la realización de los análisis microbiológicos se seguirán los métodos aprobados por la Orden de 8 de Mayo de 1987 (Año. 1987)".

En estos métodos oficiales se indica como debe prepararse la muestra para el análisis una vez recibida en el laboratorio pero no dice nada relativo a la toma de muestra ni al plan de muestreo. Para cumplir los requisitos de un criterio microbiológico moderno es necesario indicar el n° de muestras que hay que analizar en cada lote (n), el n° que puede superar los límites establecidos (c), así como el mínimo (m) y máximo (M) de estos límites. Este plan de muestreo está previsto en la Reglamentación propuesta del Codex Alimentarius (Alinorm 85/13A) para aguas minerales naturales, por lo que supongo que podría utilizarse una vez aprobada; ya que en el Artículo 14.2 se especifica que "en ausencia de métodos oficiales de toma de muestra podrán ser utilizados los aprobados por Organismos de reconocida solvencia".

Otra paradoja es que en estos métodos oficiales tampoco se encuentran los relativos al recuento de microorganismos revivificables a 22°C y 37°C. Como ya hemos expuesto anteriormente el empleo de un mismo método de recuento y medio de cultivo es imprescindible para obtener resultados comparables. Como sugerencia podrían utilizarse los mismos que para el agua de abastecimiento.

Los métodos descritos para la investigación de los indicadores fecales y P.aeruginosa tienen el problema que se refieren a 100 ml de muestra, cuando la legislación actual requiere el análisis de 250 ml. Por tanto, es necesario tener ésto en cuenta y modificar las técnicas analizando 250 ml de agua.

Otro aspecto sería considerar si estos métodos son, actualmente, los más adecuados. Sólo como ejemplo me referiré al medio utilizado para la detección de coliformes por filtración (Chapman TTC). Este medio es muy poco selectivo por lo que en aguas minerales naturales con elevado nº de bacterias heterótrofas se producen interferencias. En los últimos años se han realizado numerosos estudios para determinar que medios son los más selectivos y sensibles para la investigación de coliformes fecales. Se ha demostrado que, entre los medios clásicos, es el Levine o Eosina azul de metileno el que da mejores resultados. Actualmente también se utilizan medios con substratos fluorogénicos, principalmente 4-metilumbeliferil, beta D-glucuronido (MUG), que suponen una ventaja para investigar coliformes fecales en aguas con elevado nº de bacterias heterótrofas ya que éstas no interfieren ni siquiera a niveles superiores a 10⁴/ml. La presencia de E.coli se detecta por fluorescencia al incubar a 44.5°C durante 24 horas. Estos medios han sido ya admitidos oficialmente en Estados Unidos para la detección de coliformes en aguas de abastecimiento (Federal Register, 1989) y se han ensayado en aguas naturales (Clark et al. 1991) pero no en aguas envasadas. Nosotros hemos realizado un estudio comparativo en aguas minerales naturales envasadas demostrando su eficacia y ventaja con los medios oficiales, tanto si se utiliza el método del NMP como el de filtración, por lo que lo consideramos muy adecuado para agua envasada (de la Rosa et al. 1992).

6. Conclusiones

- 1.- Es necesaria una definición más precisa de las aguas minerales naturales.
- 2 - Deben puntualizarse la periodicidad y los controles microbiológicos que hay que realizar en el punto de emergencia, producto terminado y comercializado.
- 3.- Para un mejor conocimiento de las características del agua mineral natural sería necesario estudiar periódicamente la micropoblación autóctona del punto de emergencia, pero no considero necesario realizarlo en el agua envasada.
- 4 - Deberían revisarse los límites de bacterias a 22 y 37°C tanto en el punto de emergencia como en el agua recién envasada, con criterios científicos y sanitarios recientes, teniendo en cuenta las características propias de las aguas minerales españolas.
- 5.- Por su imprecisión no debe exigirse ausencia de microorganismos patógenos, sino indicar en qué situaciones y cuales deben investigarse, por ejemplo: Salmonella, Shigella, Staphylococcus aureus, Vibrio cholerae, Enterovirus, Giardia.
- 6.- Por no ser indicadores de contaminación fecal no debería exigirse ausencia en 250 ml de coliformes totales sino de E.coli.
- 7.- Es necesario y urgente disponer de un plan de muestreo adecuado y de métodos oficiales sencillos, fiables y modernos para poder determinar **todos** los parámetros microbiológicos previstos en la Reglamentación.

BIBLIOGRAFIA

- Anónimo. 1980. Directiva del Consejo de 15 de julio 1980 relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros sobre explotación y comercialización de aguas minerales naturales. Diario Oficial de las Comunidades Europeas nº 229 de 30-8-80, pp.47-56.
- Anónimo. 1981. Ministerio de la Presidencia. Reglamentación Técnico- Sanitaria para la elaboración, circulación y comercio de las aguas de bebida envasadas. Real Decreto 2119/1981, 24 de julio. BOE nº 226, 21-9-1981, pp.21898-21903.
- Anónimo. 1987. Ministerio de Relaciones con las Cortes y de la Secretaria del Gobierno. Métodos oficiales de análisis microbiológicos para la elaboración, circulación y comercio de aguas de bebida envasadas. Orden de 8 de mayo. BOE nº 114, 13-5-1987, pp.13964-13973.
- Anónimo. 1991. Ministerio de Relaciones con las Cortes. Reglamentación Técnico-Sanitaria para la elaboración, circulación y comercio de aguas de bebida envasadas. Real Decreto 1164/1991, 22 de julio. BOE nº 178, 26-7-1991, pp. 24818-24825.
- Buttiaux, R. 1960. La surveillance bactériologique des eaux minérales en bouteilles et en boîtes. Ann. Inst. Past. Lille, **11**:23-38.
- Buttiaux, R. et A. Boudier. 1960. Comportement des bactéries autotrophes dans les eaux minérales conservées en récipients hermétiquement clos. Ann. Inst. Pasteur Lille, **11**:43-52.
- Clark, D.L., B.B. Milner, M.H. Stewart, R.L. Wolfe and B.H. Olson. 1991. Comparative study of commercial 4-methylumbelliferyl-beta-D-glucuronide preparations with the Standard Methods membrane filtration fecal coliform test for the detection of Escherichia coli in water samples. App. Environ. Microbiol. **57**:1528-1534.
- Dalabroise, A.M. et R. ducluzeau. 1974. Le microbisme naturel de l'eau minérale, son développement, son innocuité sur l'organisme. Ann. Hyg. L.F. Med. Nut. **2**:189-192.
- Federal Register. 1989. Drinking water; national primary drinking water regulations; total coliform: proposed rule. Fed. Regist. **54**: 27544 -27567.
- González, C., C. Gutierrez and T. Grande. 1987. Bacterial flora in bottled uncarbonated mineral drinking water. Can. J. Microbiol. **33**:1120-1125.
- Leclerc, H. 1991. Les eaux minerales naturelles: aspects microbiologiques et reglamentaires. Jornada Científica Internacional sobre actualización de los criterios de calidad de las aguas minerales naturales. Palma de Mallorca.
- Leclerc, H. et D.A. Mossel. 1989. Microbiologie: le tube digestif, l'eau et les aliments. Doin Ed. Paris.
- Manaia, C.M., O.C. Nunes, P.V. Morais and M.S. da Costa. 1990. Heterotrophic plate counts and the isolation of bacteria from mineral waters on selective and enrichment media. J. Appl. Bacteriol. **69**:871-876.

- Morais,P.V. and M.S. da Costa. 1990. Alterations in the major heterotrophic bacterial populations isolated from a still bottled mineral water. *J.Appl. Bacteriol.* **69**:750-757.
- Moro,I. y M.C. de la Rosa. 1987. Contribución al estudio de la micropoblación de aguas minerales envasadas. *Bol.Soc. Esp. Hidrol. Med.* **3**:127-131.
- Mossel,D.A.1982. Marker (index and indicator) organisms in food and drinking water. Semantics,ecology, taxonomy and enumeration. *Antonie v. Leeuw.* **48**:609-611.
- Mosso,M.A.,M.C. de la Rosa y F.Díaz. 1985. Distribución anual de la micropoblación en manantiales de aguas mineromedicinales de Carabaña. *Anal. Bromatol.* **37**:261-269.
- Mosso,M.A.,de la Rosa y F. Díaz. 1988. Microbiología del manantial de aguas mineromedicinales y de los lodos del balneario de Arnedillo. *Real Acad. Farm.Monografía nº 14*:23-28.
- Mosso,M.A.,M.C. de la Rosa,F. Díaz, C. Vivar y R. Medina. 1990. Microbiología del manantial de aguas mineromedicinales de Alange. *Real Acad. Farm. Monografía nº 16*:27-38.
- Mosso,M.A.,M. C. de la Rosa,C. Vivar,F.Díaz y R. Medina. 1990. Aplicación del método de fluorescencia AODC para el recuento de microorganismos en aguas mineromedicinales. VII Reunión Científica de Microbiología de los Alimentos,pp. 121.Barcelona.
- Oger C.,J.F.Hernandez,J.M.Delattre,A.H.Delabroise et S.Krupsky. 1987. Etude par épifluorescence de l'évolution de la microflore totales dans une eau minérale embouteillée. *Wat.Res.***21**:469-474.
- Quevedo-Sarmiento,J.,A.Ramos-Cormenzana and J. González-López. 1986. Isolation and characterization of aerobic heterotrophic bacteria from natural spring waters in the Lanjarón area (Spain). *J.Appl.Bacteriol.***61**:365-372.
- Rosa,M.C.de la,M.A.Mosso,F.Díaz y J.A.Castellanos. 1987. Microbiología de los manantiales de aguas mineromedicinales del balneario de Fortuna. *Real Acad. Farm.Monografía nº 13*:19-25.
- Rosa,M.C.de la,M.A. MAosso,F.Díaz,M.C. Vivar y M.R. Medina. 1991. Microbiología de los manantiales de aguas mineromedicinales de Fitero.*Real Acad. Farm. Monografía nº18*:45-60.
- Rosa,M.C. de la,A.Mosso,M.C.Vivar,G.Arroyo y F.Díaz. 1992. Detección de Escherichia coli en aguas envasadas utilizando medios con MUG (4-metil-umbeliferil,beta D-glucurónido).VIII Reunión Científica de Microbiología de los Alimentos.Cáceres.
- Schmidt-Lorenz,W.1976. Microbiological characteristics of natural mineral water. *Ann.Ist.Super. Sanità.* **12**:93-112.
- Schwaller,P. et W.Schmidt-Lorenz. 1982. Temperatures maximales de croissance chez des bactéries oligocarbotolérantes isolées d'eaux minérales naturelles et non gazeifiées. *Brauerei-Rundschau* **3**:53-58.
- Tabor,P.A. and R.A. Neihof. 1982. Improved method for determination of respiring individual microorganisms in natural water. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**:1249-1255.

- Veron, M. 1989. Pseudomonas aeruginosa. In: Bacteriologie Medicale. Le Minor, L. et M. Veron. Flammarion. Ed.
- Warburton, D.W., P.I. Peterkin, K.F. Weiss and M.A. Johnson. 1986. Microbiological quality of bottled water sold in Canada. Canada J. Microbiol. **32**:891-893.