

Rivista Scientifica

Igiene e Sanità Pubblica

*fondata nel 1945 da Gaetano Del Vecchio
già diretta da Gaetano e Vittorio Del Vecchio*



*Custodit vitam qui custodit sanitatem
Sed prior est sanitas quam sit curatio morbi
(Flos Medicinae Scholae Salerni)*

ESTRATTO

in formato elettronico autorizzato dagli Autori e dall'Editore

Giuseppe Signorile, Francesco Bagordo, Antonella De Donno, Maria Teresa Montagna

***Evoluzione della flora microbica e della sostanza organica
in un'acqua minerale imbottigliata***

Periodico bimestrale

Volume LVIII - N. 1/2 - Gennaio / Aprile 2002

IgSanPubbl - Issn 0019-1639

www.igiene.org

Igiene e Sanità Pubblica

Direttore Responsabile
Augusto Panà

Direttore Editoriale
Armando Muzzi

Redazione
Cattedra di Igiene e Medicina Preventiva
Università di Roma Tor Vergata

Capiredattore
Giuseppe Cananzi, Elisabetta Franco

Coordinatore
Natalia Buzzi

Comitato Scientifico
Giovanni Berlinguer, Antonio Boccia,
Vittorio Carreri, Gaetano M. Fara,
Bertram Flehmig, Giuseppe Giammanco,
Antonino Gullotti, Elio Guzzanti,
Alessandro Maida, Marck McCarthy,
Cesare Meloni, Bruno Paccagnella,
Walter Ricciardi, Gianfranco Tarsitani,
Giancarlo Vanini

Segreteria di Redazione
Iolanda Mozzetta, Vito Cerullo

Redazione Sito Internet
Giulia Zamponi

Traduzioni a cura di
Henrike Berg, Steffen P. Berg, Ilaria Restifo

Impaginazione e Grafica
Nebo Ricerche PA, Roma

Norme editoriali in 3^a di copertina.

Hanno collaborato a questo numero
U.L. Aparo, F. Bagordo, R. Barni, S. Bolzoni,
L. Bonadonna, C. Bonazzi, R. Briancesco,
R. Burani, C. Cataldo, S. Cavallaro,
A. De Donno, G. Del Corno, C. Di Domenico,
I. Di Girolamo, A. Di Paolo, M. Galea,
A. Galetti, G. Giammanco, M.C. Giangrasso,
C. Maggioni, E. Mancini, G. Marinoni,
M.T. Montagna, A. Paterno, A. Pavan,
S. Pignato, E. Pirola, M. Prota, M. Sapienza,
A. Scalamandrè, G. Serio, F. Setoud,
G. Signorile, S. Tabolli, P. Trerotoli

IGIENE E SANITÀ PUBBLICA È INDICIZZATA SU MEDLINE E INDEX MEDICUS.

Garanzia di riservatezza

Il trattamento dei dati personali che riguardano Autori e Abbonati viene svolto nel rispetto di quanto stabilito dalla Legge n. 675 del 1996 sulla Tutela dei dati personali. I dati non saranno comunicati o diffusi a terzi e per essi l'Autore o l'Abbonato potrà richiedere, in qualsiasi momento, la modifica o la cancellazione, scrivendo all'Editore.

Igiene e Sanità Pubblica - Periodico bimestrale a carattere scientifico
Reg. Trib. di Roma n. 4198 del 19.10.1954

Proprietà artistica e letteraria riservata

Realizzato con il contributo dell'Università degli Studi di Roma Tor Vergata
Accreditato SItI - Società Italiana di Igiene, Medicina Preventiva e Sanità Pubblica

Evoluzione della flora microbica e della sostanza organica in un'acqua minerale imbottigliata

Giuseppe Signorile ⁽¹⁾, Francesco Bagordo ⁽²⁾,
Antonella De Donno ⁽²⁾, Maria Teresa Montagna ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Sezione di Igiene, Dip. di Medicina Interna e Medicina Pubblica, Università di Bari

⁽²⁾ Lab. di Igiene, Dip. di Scienze e Tecnologie Biologiche e Ambientali, Università di Lecce

Parole chiave: Acqua minerale; Flora microbica; Sostanza organica.

Riassunto È stata condotta per 15 settimane (gennaio-maggio 2001) un'indagine sull'evoluzione, in rapporto alla quantità di sostanza organica, della carica microbica totale a 37°C ed a 20°C in un'acqua minerale priva di CO₂, imbottigliata in contenitori di vetro scuro e tenuta a temperatura ambiente. Sono stati registrati due incrementi apprezzabili di carica microbica, rispettivamente intorno alla seconda e undicesima settimana. In tutto il periodo di osservazione si è evidenziata una relazione fra carica microbica e sostanza organica.

Evolution of Microbial flora and organic matter in bottled mineral water

Keywords Mineral water; Microbial flora; Organic matter.

Summary A 15-week survey was carried out by the authors in order to detect the total microbial count and the quantity of organic matter in mineral waters bottled in dark glass containers and stored at room temperature. Two different and significant increases were registered at the 2nd and 11th week respectively. A relation between microbial count and organic matter was observed during the period examined.

L'évolution de la flore microbienne et des substances organiques dans les bouteilles d'eau minérale

Mots-clé Eau minérale; Flore microbienne; Substances organiques.

Résumé Les auteurs ont mené une étude de 15 semaines pour déceler la charge microbienne et les substances organiques des eaux minérales dans des bouteilles de verre foncé et gardées à température ambiante. Deux augmentations remarquables ont été enregistrées au cours de la 2^{ème} et de l'11^{ème} semaine. Une relation entre la charge microbienne et les substances organiques a été observée pendant la période examinée.

Die Entwicklung der Mikrobenflora und Belastung mit organischen Substanzen in abgefülltem Mineralwasser

Schlüsselwörter Mineralwasser; Mikrobenflora; Organische Substanz.

Zusammenfassung Über einen Zeitraum von 15 Wochen (Januar bis Mai 2001) wurde die Entwicklung der mikrobiellen Belastung, bezogen auf den Gehalt an organischer Substanz, in Mineralwasser ohne CO₂ in Dunkelglasflaschen bei Temperaturen von 37° und 20°C untersucht. Zwei deutliche mikrobielle Belastungsgipfel wurden in der zweiten und der elften Woche festgestellt. Während der Untersuchungsperiode konnte eine Beziehung zwischen mikrobieller Belastung und Gehalt an organischer Substanz beobachtet werden.

Introduzione

Lo *status* microbico (flora autoctona e alloctona) di un'acqua minerale non rimane costante nel tempo ma va incontro a modificazioni quantitative. Dopo l'imbottigliamento, infatti, intervengono normali fenomeni di proliferazione microbica che possono protrarsi per 1-4 settimane seguiti da un lento decremento^(2,4,6,9,10,14,15,16,17,18,19,20). L'andamento dell'evoluzione della carica microbica dipende da diversi fattori: specie presenti, temperatura e periodo di conservazione, tipo di contenitore, sostanza organica presente, pH condizionato quest'ultimo soprattutto dalla quantità di anidride carbonica (CO₂) presente in modo naturale o addizionata.

In una precedente indagine condotta dagli Autori sull'evoluzione della carica microbica in un'acqua minerale priva di CO₂, imbottigliata in contenitori di vetro, PET e brick e conservata a differenti condizioni di temperatura ed esposizione alla luce, si è osservato, in accordo con i dati di letteratura, un picco della carica intorno alla terza settimana dall'imbottigliamento cui ha fatto seguito un secondo picco tra l'undicesima e la tredicesima settimana di entità variabile a seconda delle condizioni sperimentali⁽²¹⁾. Mentre il picco iniziale risulta costantemente legato all'utilizzo da parte della flora microbica delle sostanze organiche presenti all'origine, si è ipotizzato, in quell'indagine, che il secondo picco era in relazione alla presenza dei cataboliti utilizzati dai microrganismi residui per la loro riproduzione.

Il secondo incremento di carica microbica si era rivelato, in alcune delle condizioni sperimentali prese in esame, quasi sovrapponibile al primo, evidenza che ha portato ad ipotizzare un ulteriore apporto di sostanze nutrienti, dovuto alla presenza di batteri chemioautotrofi, che hanno la capacità di usare composti inorganici per la produzione di sostanza organica. Questi microrganismi presentano un'alta specificità nei confronti del substrato inorganico utilizzato come fonte di energia e sono in grado di sopravvivere in acque povere di sostanze organiche, che a determinate concentrazioni possono inibire la loro crescita⁽²²⁾.

Il presente lavoro concentra l'attenzione sulla relazione fra l'evoluzione della carica microbica totale a 37°C ed a 20°C e la quantità di sostanza organica in un'acqua minerale priva di CO₂, imbottigliata in contenitori di vetro scuro tenuti a temperatura ambiente (in queste condizioni sperimentali nello studio precedente si era osservato un consistente secondo incremento della carica microbica).

Materiali e Metodi

La *tavola 1* riporta le caratteristiche chimico fisiche dell'acqua minerale studiata. I controlli sono stati effettuati con frequenza settimanale, per 15 settimane, a partire dal momento dell'imbottigliamento, nel gennaio 2001, fino a maggio 2001.

Per ogni campione è stata effettuata la determinazione della carica microbica totale a 37°C e a 20°C, secondo le metodiche ministeriali ⁽⁸⁾, e della sostanza organica (ossidabilità) con la tecnica di Kubel e Thieman ⁽¹⁾. Le valutazioni sono state replicate, ad ogni controllo, su cinque campioni diversi di acqua minerale.

I dati ottenuti sono stati riportati in grafico ed analizzati con il software Microsoft Excel 2000.

Risultati

Nelle *tavole 2 e 3* sono riportati i risultati relativi alle cariche microbiche, rispettivamente a 37°C ed a 20°C, riscontrati nelle 15 settimane di osservazione. L'andamento della carica microbica, sia a 37°C sia a 20°C, ha evidenziato un notevole incremento dei valori nelle prime settimane di osservazione, passando dalle poche unità misurate nella settimana dell'imbottigliamento alle 58.670 u.f.c./ml a 37°C e 57.150 u.f.c./ml a 20°C dopo due settimane di osservazione. Successivamente la carica microbica è andata progressivamente diminuendo fino alla decima settimana, quando si è verificato un nuovo incremento, più modesto del precedente, con un picco alla undicesima settimana: 5.124 u.f.c./ml a 37°C e 5.744 u.f.c./ml a 20°C. Dopo l'undicesima settimana i valori di carica microbica hanno subito un decremento fino a stabilizzarsi, al termine dell'osservazione, attorno a valori dell'ordine di 10² u.f.c./ml.

Tavola 1

Caratteristiche chimico-fisiche dell'acqua in esame

Temperatura dell'acqua alla sorgente	16°C
Esponente di idrogeno (pH)	7,47
Conducibilità elettrica specifica a 20°C	6,8×10 ⁴ W ⁻¹ cm ⁻¹
Residuo fisso a 180°C	380,5 mg/l
Durezza totale (gradi francesi)	29,12
Anidride carbonica libera	13,18 cm ³
Ione sodio (Na ⁺)	33,60 mg/l
Ione potassio (K ⁺)	2,800 mg/l
Ione calcio (Ca ⁺⁺)	545,3 mg/l
Ione magnesio (Mg ⁺⁺)	34,8
Ione ammonio (NH ₄ ⁺)	assente
Silice (SiO ₂)	assente
Ione Ferro (Fe ⁺⁺)	0,008 mg/l
Ione cloridrico (Cl ⁻)	62,40 mg/l
Ione solforico (SO ₄ ⁼)	14,00 mg/l
Ione bicarbonato (HCO ₃ ⁻)	297,7 mg/l
Ione nitrito (NO ₂ ⁻)	assente
Ione nitrato (NO ₃ ⁻)	28,50 mg/l
Ione fluoridrico (F ⁻)	0,300 mg/l

Tavola 2
Risultati relativi alla carica microbica a 37°C presente nell'acqua minerale nelle 15 settimane di osservazione

settimana	Carica microbica a 37°C (u.f.c./ml)	
	media	dev. std
0	5	3,4
1	6.720	867
2	58.670	28.516
3	38.150	9.793
4	15.988	4.207
5	9.179	2.405
6	5.564	1.896
7	2.132	343
8	3.722	495
9	1.582	558
10	1.973	839
11	5.124	896
12	1.634	577
13	897	484
14	352	112
15	290	57

Tavola 3
Risultati relativi alla carica microbica a 20°C presente nell'acqua minerale nelle 15 settimane di osservazione

settimana	Carica microbica a 20°C (u.f.c./ml)	
	media	dev. std
0	7	2,9
1	10.648	2.364
2	57.150	25.262
3	38.170	12.284
4	16.160	7.563
5	7.470	2.939
6	5.619	1.654
7	3.985	2.549
8	3.293	768
9	1.517	467
10	1.932	679
11	5.744	772
12	2.087	538
13	904	496
14	385	109
15	305	110

I risultati relativi alla quantità di sostanza organica presente nell'acqua minerale nelle 15 settimane di osservazione sono riportati nella *tavola 4*. È stata registrata una progressiva diminuzione della sostanza organica, che intorno alla quarta settimana ha raggiunto un valore minimo di circa 0,2 mg/l di O₂, a partire da un valore iniziale di 0,8 mg/l di O₂. Ha fatto seguito un aumento della quantità di sostanza organica, con un picco alla sesta settimana pari a 0,6 mg/l di O₂, stabilizzandosi, successivamente, intorno alla concentrazione di 0,4 mg/l di O₂.

Le *figure 1 e 2*, infine, illustrano la correlazione, durante il periodo di osservazione, tra carica microbica, rispettivamente a 37°C ed a 20°C, e sostanza organica. I valori della carica microbica sono riportati nei rispettivi logaritmi naturali al fine di permettere un migliore confronto.

Conclusioni

I risultati dell'indagine condotta sull'acqua minerale piatta hanno evidenziato nelle prime settimane una intensa proliferazione della popolazione batterica inizialmente presente, seguita da un lento e progressivo decremento. Tale andamento è da attribuire al consumo delle sostanze organiche nutritive presenti all'origine nell'acqua^(11,12,13,23). Difatti, nello stesso periodo di osservazione, si è registrata una progressiva diminuzione della

Tavola 4
Risultati relativi alla quantità
di sostanza organica ossidabile
presente nell'acqua minerale
nelle 15 settimane di osservazione

settimana	Sostanze organiche (mg/l O ₂)	
	media	dev. std
0	0,796	0,064
1	0,456	0,030
2	0,354	0,036
3	0,194	0,021
4	0,170	0,010
5	0,350	0,038
6	0,601	0,030
7	0,580	0,023
8	0,527	0,047
9	0,368	0,033
10	0,320	0,028
11	0,424	0,022
12	0,376	0,036
13	0,440	0,057
14	0,379	0,039
15	0,400	0,028

sostanza organica ossidabile, che attorno alla quarta settimana ha raggiunto il valore minimo.

La flora autoctona, più volte caratterizzata nell'acqua minerale ^(3,5), rientra nella classe dei batteri mesofili, altamente specializzati dal punto di vista fisiologico, che possono ricavare il carbonio e l'energia per la loro crescita dall'ossidazione dei composti organici ⁽²²⁾.

L'aumento della quantità di sostanza organica che si è verificata a partire dalla sesta settimana, è attribuibile alla presenza di microrganismi chemioautotrofi, la cui presenza, come per i mesofili, è stata più volte documentata in acque minerali ⁽⁷⁾.

Anche il parallelo, costante decremento della carica batterica fino all'undicesima

settimana, può essere connesso ad una proprietà intrinseca di questi batteri: l'incapacità di crescere a spese dei substrati organici.

Tra l'undicesima e la dodicesima settimana si è osservato un incremento della carica microbica ed una contemporanea diminuzione della quantità di sostanza organica ossidabile. L'ipotesi avanzata è che i microrganismi responsabili del secondo picco utilizzerebbero i cataboliti batterici e/o le sostanze organiche sintetizzate dalle specie chemioautotrofe, il cui contenuto era aumentato nelle settimane precedenti.

Dopo la tredicesima settimana i valori della carica batterica totale, a 37°C ed a 20°C, sono diminuiti probabilmente per l'insorgenza di meccanismi di depurazione spontanea ^(11,12,13), mentre la sostanza organica ha continuato a decrescere fino al raggiungimento di una concentrazione di 0,4 mg/l di O₂ che si è mantenuta pressoché costante fino al termine del periodo di osservazione.

Dall'analisi dei risultati ottenuti si può ragionevolmente ipotizzare che nell'acqua minerale imbottigliata oggetto della nostra indagine vi sia, non solo nelle prime settimane dell'imbottigliamento ma in tutto il periodo di osservazione,

una evidente relazione fra carica microbica e quantità di sostanza organica disciolta. Tuttavia uno studio approfondito mediante, ad esempio, la caratterizzazione della flora microbica e del suo rapporto con la sostanza organica spiegherebbe meglio questa interazione. Ricerche tendenti a tal fine sono già in atto nel nostro laboratorio.

Bibliografia

- ⁽¹⁾ APHA, AWWA, WEF. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. XIX Ed. 1995.
- ⁽²⁾ Baldini I, Correnti E, Scandelari E. *Rilievi ed osservazioni delle modificazioni, nel tempo, della flora microbica naturale di un'acqua minerale imbottigliata in relazione al giudizio igienico*. *Ann San Pub*, 1972; 33:1009-1021.
- ⁽³⁾ Boccia A, De Giusti M, De Vito E. *Facies microbica di un'acqua minerale: studio della sua evoluzione quali-quantitativa*. In: *Atti del 34° Congresso Nazionale S.It.I "Ambiente e Salute - esperienza e ruolo dell'igienista"*. Roma, 16-19 aprile 1991.
- ⁽⁴⁾ Buttiaux R, Boudier A. *Comportement des bactéries autotrophes dans les eaux minérales conservées en récipient hermétiquement clos*. *Ann Ist Pasteur de Lille* 1990; 11:43-83.
- ⁽⁵⁾ Carbone A, Capunzo M, Mellino M. *Sul controllo delle caratteristiche microbiologiche di acque minerali in libera vendita nella città di Napoli*. *Ig Mod* 1985; 83:500-509.
- ⁽⁶⁾ De Fusco R, Biscardi D, Mazzacca FR. *Variazioni batteriche in un'acqua medio-minerale imbottigliata in contenitori di PET*. *Ann Ig* 1989; 1:1255-1267.
- ⁽⁷⁾ De Giusti M, Boccia A, Serra A, Del Commuto A. *Caratterizzazione della facies microbica di un'acqua minerale naturale*. *Ann Ig* 1993; 5:365-370.
- ⁽⁸⁾ Decreto Ministeriale del 13.01.1993. *Metodi per la valutazione delle caratteristiche microbiologiche e di composizione delle acque minerali naturali e modalità per i relativi prelievi dei campioni*. *Gazzetta Ufficiale* del 19 gennaio 1993 n. 14.
- ⁽⁹⁾ Del Vecchio V, Fischetti M. *Andamento nel tempo della flora saprofitica presente in acque minerali: confronto fra contenitori di vetro e contenitori di plastica*. *Nuovi Ann di Ig Microbiol* 1972; 23:257-277.
- ⁽¹⁰⁾ El-Zanfaly ET. *The concepts of heterotrophic bacteria limit in bottled water as quality criteria*. *Riv Ital Ig* 1990; 50:440-446.
- ⁽¹¹⁾ Fischetti M. *Comportamento, nel tempo, della flora microbica saprofitica presente in acque minerali imbottigliate. Nota I: ricerca condotta nel 1966-67 su un'acqua medio-minerale*. *Nuovi Ann di Ig e Microbiol* 1968; 19:757-772.
- ⁽¹²⁾ Fischetti M. *Comportamento, nel tempo, della flora microbica saprofitica presente in acque minerali imbottigliate. Nota II: ricerca condotta nel 1967 su un'acqua oligominerale*. *Nuovi Ann di Ig e Microbiol* 1968; 19:773-781.
- ⁽¹³⁾ Fischetti M. *Comportamento, nel tempo, della flora microbica saprofitica presente in acque minerali imbottigliate. Nota III: ricerca condotta nel 1967-68 su un'acqua minerale*. *Nuovi Ann di Ig e Microbiol* 1968; 19:782-790.

Figura 1
Andamento della carica microbica a 37°C e della sostanza organica
durante le 15 settimane di osservazione

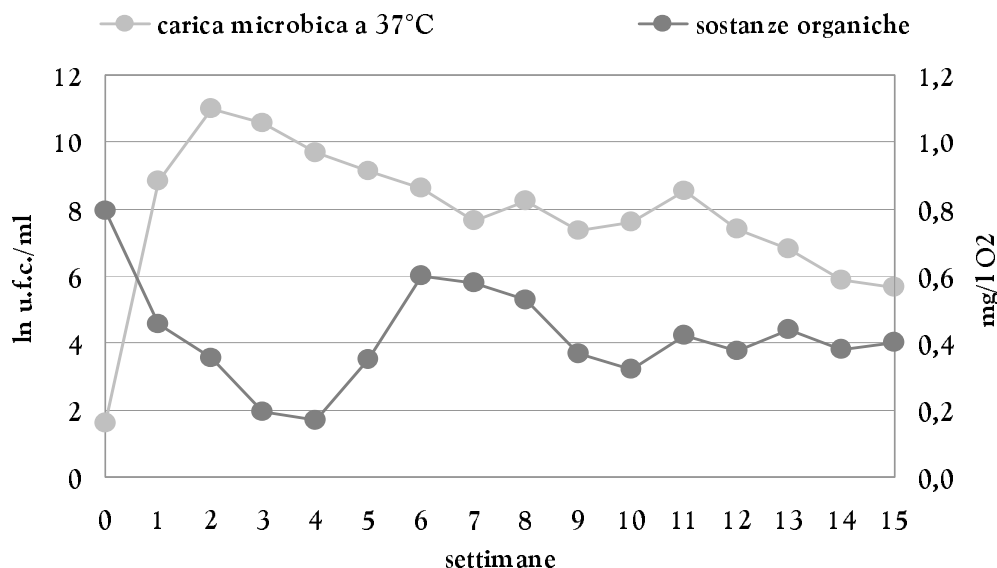
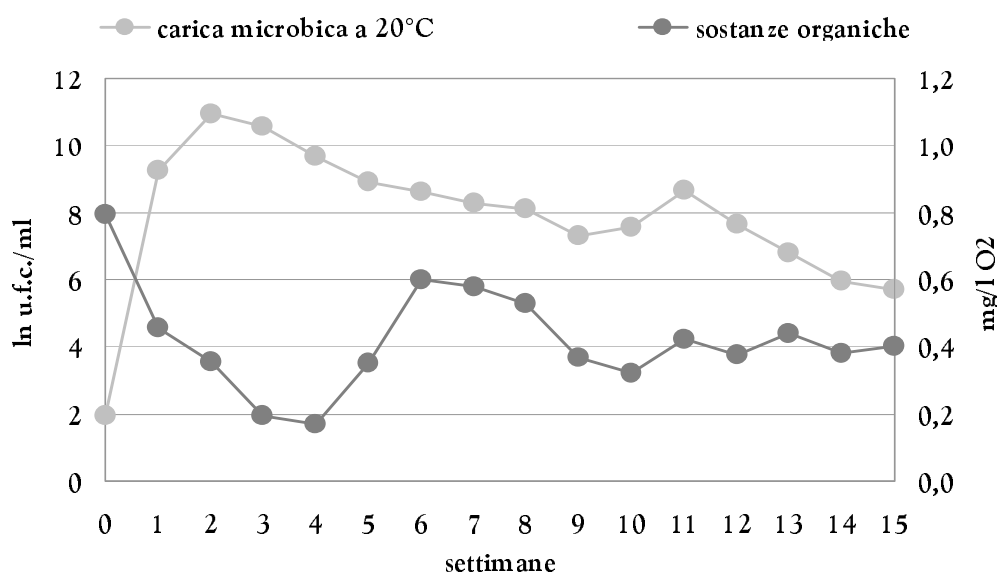


Figura 2
Andamento della carica microbica a 20°C e della sostanza organica
durante le 15 settimane di osservazione



- ⁽¹⁴⁾ Legnani P, Leoni E, Rapano S, Turin D, Valenti C. *Survival and growth of Pseudomonas aeruginosa in natural mineral water. A 5-year study.* International Journal of Food Microbiology 1999; 53:153-158.
- ⁽¹⁵⁾ Lucas F, Ducluzeau R. *Behavior of the autochthonous flora of mineral water from Vittel in the digestive tract of axenic mice, its antagonistic effect on Escherichia coli in vitro.* Riv Ital Ig 1990; 50:383-393.
- ⁽¹⁶⁾ Meloni P, Cois A, Sau M, Schintu M, Contu A. *Valutazione della flora microbica in differenti tipi di contenitori per le acque minerali in commercio.* Riv Ital Ig 1990; 50:499-505.
- ⁽¹⁷⁾ Pasquini R, Savino A, Scassellati Sforzolini G. *Analisi microbiologiche di acque minerali del commercio imbottigliate in recipienti di vetro e di plastica.* Ann Sclavo 1974; 69:433-434.
- ⁽¹⁸⁾ Pasquini R, Scassellati Sforzolini G, Savino A, Conti R. *Caratterizzazione della flora microbica di un'acqua oligominerale imbottigliata in contenitori di vetro e di plastica e sua quantificazione durante un lungo periodo di conservazione.* Ig Mod 1976; 69:37-67.
- ⁽¹⁹⁾ Savino A, Pasquini R, Scassellati Sforzolini G. *Indagini sulle cause del differente contenuto microbico di acque minerali imbottigliate in contenitori di vetro e di plastica.* Ann Sclavo 1976; 16:434-436.
- ⁽²⁰⁾ Scassellati Sforzolini G. *Osservazioni chimiche e microbiologiche sulle acque imbottigliate nei contenitori a perdere.* Relazione presentata al II Congresso Internazionale sull'imbottigliamento delle acque minerali. Verbania, 9-11 giugno 1972.
- ⁽²¹⁾ Signorile G, Montagna MT, De Donno A, Sasso M. *Indagini su acque minerali commercializzate in contenitori di vetro plastica e brick. Nota 2: evoluzione della carica microbica totale.* Ann Ig 1997; 9:15-22.
- ⁽²²⁾ Stanier R, Wheelis M, Ingraham J, Painter P. *Il mondo dei microrganismi.* Ed. Zanichelli, 1993.
- ⁽²³⁾ Toti L. *Aspetti microbiologici delle acque minerali.* Ig Mod 1993; 99:89-91.

Referente: Giuseppe Signorile

Dipartimento di Medicina Interna e Medicina Pubblica, Sezione di Igiene

Università degli Studi di Bari, Policlinico

Piazza Giulio Cesare, 4 - 70124 - Bari

tel.: 080 5478477 fax: 080 5478472 e-mail: g.signorile@igiene.uniba.it

Editoriale

Igiene e Sanità Pubblica accreditata su MEDLINE	1
---	---

Parte Scientifica e Pratica

R. Barni, S. Bolzoni, C. Bonazzi, R. Burani, G. Del Corno, A. Galetti, C. Maggioni, G. Marinoni, A. Pavan, E. Pirola, F. Setoud Valutazione degli aspetti organizzativi e di processo di una campagna di diagnosi precoce del cancro della mammella nella ASL Provincia di Milano 1	5
S. Pignato, M. Galea, M.C. Giangrasso, S. Cavallaro, M. Sapienza, G. Giammanco Considerazioni circa l'utilità del monitoraggio della presenza di legionelle in ambiente ospedaliero: una esperienza presso un ospedale siciliano	17
A. Paterno, P. Trerotoli, G. Serio La situazione demo-sanitaria degli immigrati clandestini: considerazioni sul contingente albanese giunto in Puglia nel 1997	25
L. Bonadonna, R. Briancesco, C. Cataldo, I. Di Girolamo Qualità microbiologica delle sabbie marine: una spiaggia del Lazio	43
G. Signorile, F. Bagordo, A. De Donno, M.T. Montagna Evoluzione della flora microbica e della sostanza organica in un'acqua minerale imbottigliata	55

Note di Approfondimento

U.L. Aparo, S. Tabolli Il Direttore Sanitario e la Clinical Governance	63
M. Prota, A. Di Paolo, C. Di Domenico, A. Scalamandrè Eziologia di malattie rare da nuovi agenti virali: una indagine della letteratura più recente	75

Note di Aggiornamento

E. Mancini Orientamenti bioetici per l'equità nella salute Comitato Nazionale per la Bioetica, Roma, 25 maggio 2001	89
--	----