



Ocorrência de *Pseudomonas aeruginosa* em água mineral e métodos microbiológicos

Daniele Ferreira do **Prado**¹; Adriane Narumi Onodera **Andrade**²; Gabriela Cristina Moita **Vieira**²;
Silvia Andrea **Morelli**²; Margarete Midori **Okazaki**³

Nº 20219

RESUMO – O objetivo do presente estudo foi avaliar a ocorrência de *Pseudomonas aeruginosa* em amostras de água mineral de diferentes marcas comercializadas no Estado de São Paulo, utilizando o método dos tubos múltiplos, conforme preconizado no Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater e a técnica de filtração em membrana usando o meio cromogênico RAPID[®] P. *aeruginosa* Agar[®]. Em 102 amostras avaliadas, seis (5,9%) e quatro (3,9%) estavam impróprias para o consumo humano, de acordo com os resultados obtidos, respectivamente, através da técnica de filtração e do método dos tubos múltiplos, considerando os padrões microbiológicos estabelecidos pela Resolução RDC nº 275 de 22 de setembro de 2005, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

Palavras-chaves: água mineral, *Pseudomonas aeruginosa*, microbiologia, bactérias.

ABSTRACT – The objective of the present study was to evaluate the occurrence of *Pseudomonas aeruginosa* in mineral water samples of different brands marketed in the State of São Paulo using the multiple tube method, as recommended in the Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater and the technique of membrane filtration using the chromogenic medium RAPID[®] P. *aeruginosa* Agar[®]. In 102 samples evaluated, two (3.4%) and four (3.9%) were unfit for human consumption, according to the results obtained, respectively through the filtration technique and the multiple tube method, considering the microbiological standards established by Resolution RDC 275 of September 22, 2005, of the Agency National Health Surveillance.

Keywords: mineral water, *Pseudomonas aeruginosa*, microbiology, bacteria.

1 Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): graduação em Ciências Biológicas, IB/Unicamp, Campinas-SP; danielle.prado59@gmail.com

2 Colaborador, técnica do laboratório de microbiologia do Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas-SP.

3 Orientador: pesquisador do Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas-SP; okazaki@ital.sp.gov.br



INTRODUÇÃO

Considerada como recurso essencial para a manutenção da vida, a água tem sido um dos grandes problemas do século XXI a nível de abastecimento e oferta, pois somente 0,1% do total de água não salgada (4,9%) do planeta está disponível para consumo humano (PORTO et al., 2011). A nível mundial, a carência de água apropriada para uso doméstico atinge cerca de 1,2 bilhões de pessoas (VIEIRA et al., 2011) e, aproximadamente 80% de todas as doenças que atingem os países em desenvolvimento provêm de água de má qualidade (PORTO et al., 2011).

A água mineral ou potável de mesa é obtida diretamente de fontes naturais ou por extração de águas subterrâneas. De acordo com a Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 274, de setembro de 2005, do Ministério da Saúde, água mineral natural é caracterizada pelo conteúdo definido e constante de determinados sais minerais, oligoelementos e outros constituintes, considerando as flutuações naturais (BRASIL, 2005a).

A indústria de água mineral teve sua expansão consideravelmente em todas as regiões geográficas do mundo e o seu volume de produção em 2018 atingiu uma quantidade expressiva de aproximadamente 11,5 bilhões de litros (ABIR, 2020).

De acordo com ASSIRATI (2014), o consumo mundial de água engarrafada em 2013 foi estimado em 266 bilhões de litros, 7% maior que em 2012. No Brasil, o consumo per capita de água mineral foi de 90,0 a 90,3 litros/ano no período de 2012 - 2013. No entanto, dados da Associação Brasileira das Indústrias de Refrigerantes e de Bebidas Não Alcolólicas (ABIR) apontam um consumo nacional de 43,4 a 56,6 litros ao ano per capita nesse mesmo período, e com elevação para 55,0 litros no ano de 2018 (ABIR, 2020).

O Brasil possui uma das maiores reservas de água doce do planeta (especialmente água subterrânea), com mais de 1300 nascentes naturais de água distribuídas em todo território nacional, permitindo ocupar um posicionamento geoestratégico mundial no mercado de água mineral (ROSA et al., 2008).

No entanto, a oferta desproporcional de serviços de abastecimento de água e de saneamento básico entre as regiões brasileiras tem propiciado a ocorrência de um número significativo de enfermidades causadas por consumo de água contaminada, principalmente nas regiões Norte e Nordeste do país (MENDES *et al.*, 2000). As principais doenças de veiculação hídrica que acometem a população humana têm sido as disenterias, salmonelose, shigelose, poliomielite, hepatite A, rotavíruses, verminoses, amebíase, giardíase, além das infecções epidêmicas clássicas como a



cólera e a febre tifoide (GOMES et al., 2008). Dentre as bactérias patogênicas possíveis de serem encontradas na água, destacam-se as dos gêneros: *Salmonella*, *Streptococcus*, *Shigella*, *Vibrio*, *Yersinia*, *Campylobacter*, *Escherichia* e *Pseudomonas* (VIEIRA et al., 2011).

A preocupação com a qualidade da água de rede pública, aliada à busca pelo bem-estar proporcionado pelos sais minerais naturais, provocou nos últimos anos, uma contínua demanda por água mineral em todos os países (CASTRO et al., 2010).

O presente estudo teve como objetivo, avaliar a ocorrência de *Pseudomonas aeruginosa* em amostras de água mineral de diferentes marcas comercializadas no Estado de São Paulo, utilizando o método dos tubos múltiplos, conforme preconizado no Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater (BRAUN-HOWLAND & HUNT, 2017) e a técnica de filtração em membrana usando o meio cromogênico RAPID *P. aeruginosa* Agar® (BIO-RAD, 2014).

MATERIAL E MÉTODOS

Foi avaliado um total de 9 marcas de água mineral natural, comercializadas em diferentes volumes (20 L, 10 L, 5 L, 1,5 L, 500 mL e 200 mL-310 mL) no Estado de S. Paulo, totalizando 102 amostras coletadas no período de novembro/2018 a maio/2020.

Cada amostra foi submetida à pesquisa (em 100 mL) de *P. aeruginosa*, conforme estabelecido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, através da Resolução RDC nº 275 de 22 de setembro de 2005 (BRASIL, 2005b).

As análises microbiológicas foram realizadas através do método dos tubos múltiplos, conforme preconizado no Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater (BRAUN-HOWLAND & HUNT, 2017) e também, pela técnica de filtração em membrana usando o meio cromogênico RAPID *P. aeruginosa* Agar® (BIO-RAD, 2014).

A determinação de *P. aeruginosa* pelo método de tubos múltiplos foi realizada através da adição de 10 porções de 10 mL da amostra de água em 10 tubos contendo 10 mL de caldo asparagina, em concentração dupla. Os tubos que apresentassem crescimento e produção de um pigmento verde fluorescente sob luz ultravioleta (365 nm, luz negra) após incubação a 35-37°C/24-48 h, seriam submetidos ao teste confirmativo, através da transferência de 0,1 mL do caldo asparagina contendo a amostra para a superfície de ágar acetamida em tubo, seguida de incubação a 35-37°C / 24-36 h. A alteração da cor deste meio de vermelho pálido para púrpura/magenta (“pink”)

é característica confirmativa de *P. aeruginosa*. Os resultados foram reportados como presença ou ausência de *P. aeruginosa* em 100 mL de amostra.

Na pesquisa de *P. aeruginosa* através da técnica de filtração em membrana, foi utilizado o conjunto de filtração composto de porta filtros, kitassato e copos de filtração. A parte inferior do porta filtro foi acoplada ao kitassato por uma mangueira apropriada que é conectada à uma bomba de vácuo, permitindo a filtração da amostra. O conjunto foi preparado ajustando-se a membrana estéril (47 mm de diâmetro, porosidade de 0,45 µm, branca e quadriculada) no porta filtro (com a face quadriculada da membrana para cima) e o copo de filtração sobre a membrana. Após a filtração, a membrana foi transferida para a placa de Petri contendo o meio cromogênico RAPID´*P. aeruginosa* Agar® (marca BIO-RAD), e incubada na posição invertida por 36±1°C/24 h. Colônias azuis ou verde azuladas desenvolvidas foram consideradas como típicas confirmativas de *P. aeruginosa* no meio RAPID´*P. aeruginosa* Agar®. Os resultados obtidos foram reportados como presença ou ausência de *P. aeruginosa* em 100 mL de amostra.

Os ensaios microbiológicos foram realizados no laboratório de microbiologia do Instituto de Tecnologia de Alimentos (Campinas, SP).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras de água mineral envasadas em diferentes tipos de embalagem (Figura 1) foram avaliadas dentro do prazo de validade (dois meses para água envasada nos galões de polipropileno retornáveis de 10 L e de 20 L, e 1 ano para aquelas envasadas em copos e garrafas descartáveis).

Onze amostras (10,8%) de um total de 102 avaliadas eram gaseificadas (Figura 2) e acondicionadas em garrafas PET, sendo: cinco (4,9%) em volume de 200-300 mL, três (2,9%) em 500 mL e os três restantes (2,9%) em 1,5 L.

A legislação brasileira vigente que estabelece os padrões microbiológicos para água mineral é a Resolução RDC nº 275 de 22 de setembro de 2005, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2005b) que determina ausência de *P. aeruginosa*, enterococos, clostrídios sulfito redutores, coliformes totais e *Escherichia coli* em 100 mL de água mineral e água natural.

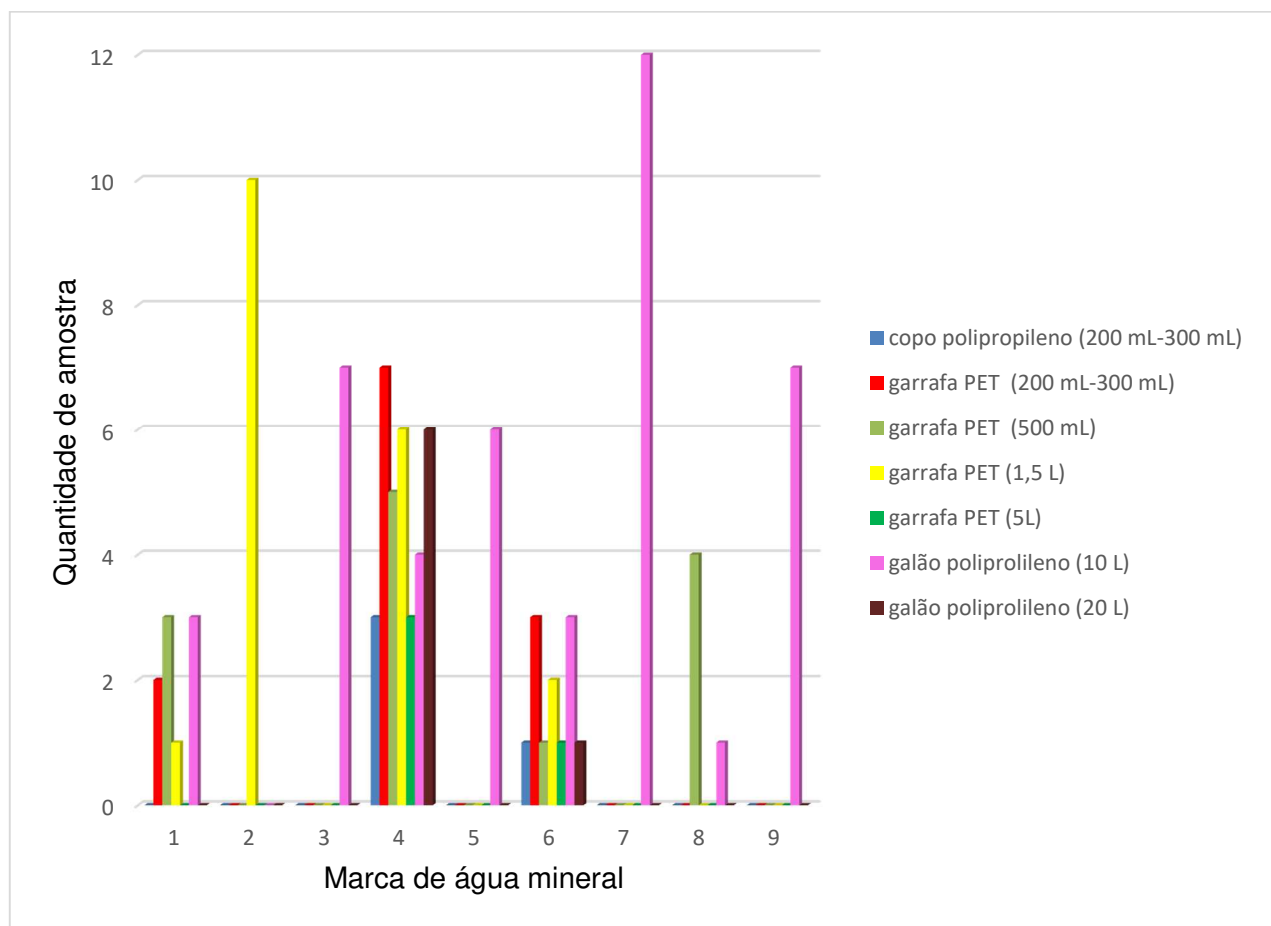


Figura 1. Amostras de água mineral avaliadas e os diferentes tipos de embalagem por marca.

A determinação de *P. aeruginosa* em amostras de água mineral é fundamental no âmbito da saúde pública, visto que águas minerais são produtos de grande consumo pela população e cujas características higiênico-sanitárias adequadas estão relacionadas à saúde dos consumidores (CASTRO *et al.*, 2010). Essa bactéria tem como uma das características importantes, a extrema versatilidade metabólica e nutricional, permitindo o uso de uma enorme variedade de compostos orgânicos como fonte de carbono e energia. Em função dessa versatilidade, as *P. aeruginosa* são amplamente distribuídas na natureza, como na água (doce, salobra ou do mar), no solo, na poeira e nos alimentos (SILVA *et al.*, 2017). Além disso, são capazes de crescer em águas com quantidade baixa de nutrientes e apresentam vários fatores de virulência, assim como resistência a antibióticos (GOMES, 2017).

Existem vários métodos para a determinação de *P. aeruginosa* em água mineral, e a legislação vigente permite o uso das técnicas de filtração em membrana e do número mais provável (NMP), para a quantificação dessas bactérias.

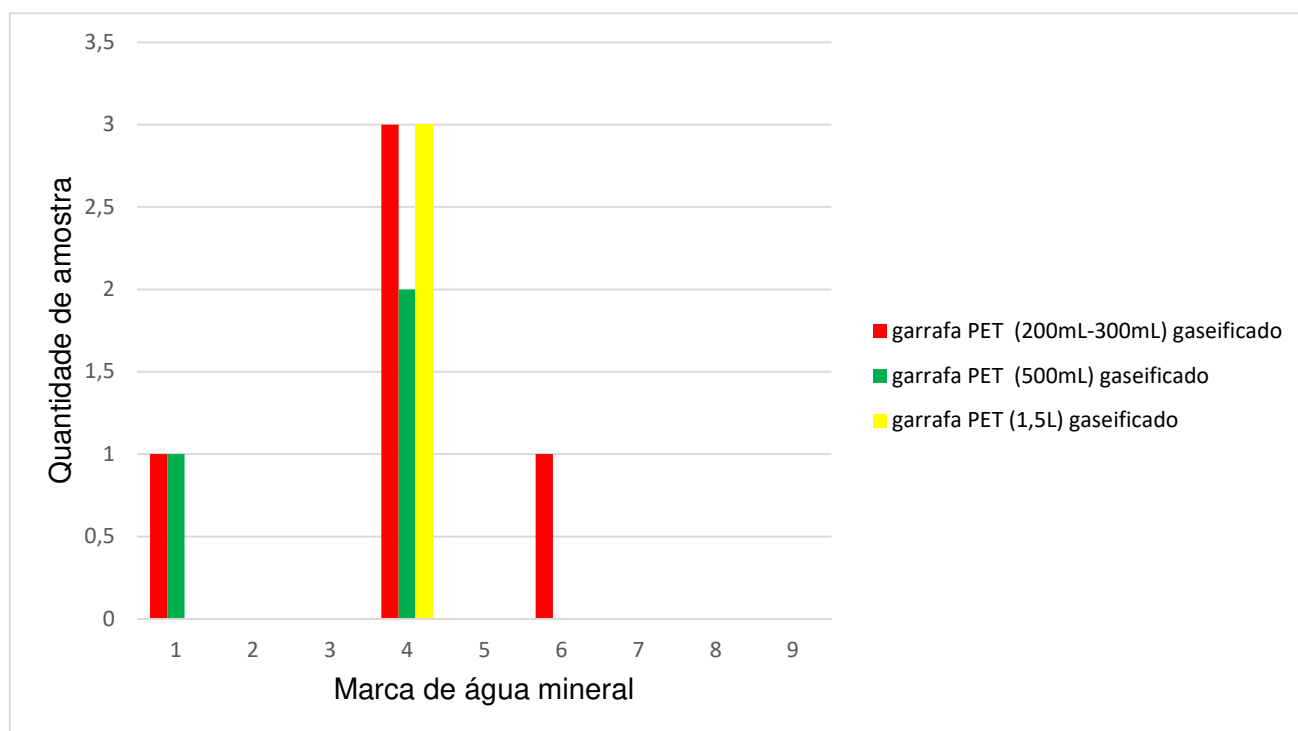


Figura 2. Amostras de água mineral gaseificadas avaliadas de diferentes volumes por marca.

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, verificou-se que a técnica de filtração em membrana utilizando o meio RAPID *P. aeruginosa* Agar® detectou amostras contaminadas em três (33,3%) marcas (B, C e D) de um total de 9 avaliadas (Figura 3), ao passo que os resultados obtidos pela técnica dos tubos múltiplos evidenciaram a presença de *P. aeruginosa* em duas (22,2%) marcas (D e G). As duas metodologias apresentaram quantidades de amostras relativamente próximas entre si com relação à presença (em 100 mL) do mesmo microrganismo alvo. Além disso, as amostras dessas marcas (B, C, D e G) provavelmente estavam com níveis muito baixos de *P. aeruginosa*, pois apenas a marca D evidenciou a presença dessa bactéria através das duas técnicas de análise.

Todas as amostras contaminadas eram isentas de CO₂, ou seja, não gaseificadas. O CO₂ dificulta o desenvolvimento de microrganismos aeróbios da microbiota natural de água mineral, como os dos gêneros *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, pois favorece a diminuição da tensão de O₂. Dentre as espécies do gênero *Pseudomonas*, as mais comuns isoladas de água mineral são: *P.mandelii*, *P. migulae*, *P. rhodesiae* e *P.veronii*, porém a *P. aeruginosa* representa a principal preocupação no âmbito da saúde pública por ser um patógeno oportunista para humanos (SILVA *et al.*, 2017).



Dentre as 102 amostras de água mineral avaliadas, 4 estavam acondicionadas em copos de polipropileno, 12 em garrafas PET 200-300 mL, 13 em garrafas PET 500 mL, 19 em garrafas PET 1,5 L, 4 em garrafa PET 5 L, 43 em galões de polipropileno retornáveis 10 L e 7 em galões de polipropileno retornáveis 20 L. Duas amostras de água envasadas em garrafas PET 1,5 L (marca B), duas outras em galões retornáveis de 10 L (marca C), uma em garrafa PET 200-300 mL (marca G) e uma outra em copo de polipropileno, totalizando seis (5,9%), evidenciaram a presença (em 100 mL) de *P. aeruginosa* pela técnica de filtração (Figura 4). O procedimento da técnica de filtração em membrana é ideal para análise de amostras líquidas límpidas e sem sólidos em suspensão como águas minerais. Além disso, a técnica permite inoculação de maiores volumes da amostra (100 mL, por exemplo), com limite de detecção de 1 UFC por volume inoculado. A técnica dos tubos múltiplos, diluição única com inoculação de 10 alíquotas de 10 mL da amostra por tubo, também é ideal para avaliação de água mineral, mesmo com níveis de contaminação baixos. Neste caso, o limite de detecção é $<1,1$ NMP/100 mL. Algumas amostras foram reprovadas por uma das técnicas (filtração em membrana ou tubos múltiplos) porém aprovadas pela outra, o que não necessariamente implica em uma técnica ser melhor que a outra, pois essa diferença no resultado pode estar associada aos níveis muito baixos de contaminação das amostras. As amostras em galões retornáveis de 20 L analisadas não apresentaram nenhuma contaminação por *P. aeruginosa*, esse fato pode ser devido às boas práticas aplicadas durante o processo de envasamento do produto.

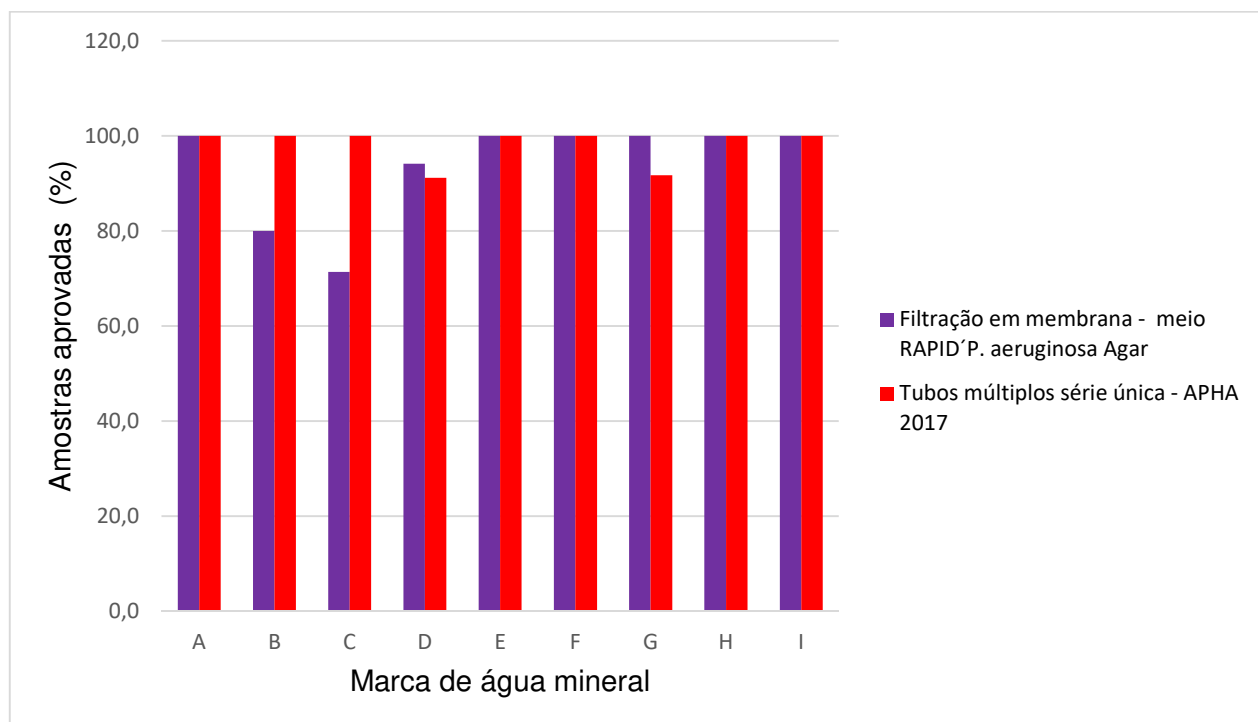


Figura 3. Percentual de amostras aprovadas por marca, para pesquisa de *P. aeruginosa*.

RITTER & TONDO (2009) avaliaram 15 amostras de água mineral comercializadas em garrafões de 20 L e fabricadas por uma indústria da região de Porto Alegre, RS. Embora os autores tenham comprovado a presença de bactérias heterotróficas em todas as amostras, através da técnica de filtração, em níveis que variaram de $1,0 \times 10$ UFC/mL a $7,0 \times 10^3$ UFC/mL, não foi detectada a presença de *P. aeruginosa*.

Resultados semelhantes ao do presente trabalho foram obtidos por SANTOS *et al.* (2012), ao avaliarem 15 amostras de água mineral comercializadas no município de Alfenas, MG. Nesse estudo os autores determinaram 3 amostras (20%) contaminadas por *P. aeruginosa* e portanto, consideradas impróprias para o consumo humano. SABIONI & SILVA (2006) também evidenciaram a presença dessa bactéria em 14% de um total de 50 amostras de água mineral analisadas e comercializadas no município de Ouro Preto, MG, corroborando portanto, na premissa de que nem sempre o consumo de água mineral natural representa uma segurança à saúde pública, visto que a bactéria *P. aeruginosa* se multiplica em águas com poucos nutrientes, e é considerado um microrganismo oportunista sendo capaz de causar infecções em indivíduos imunocomprometidos.

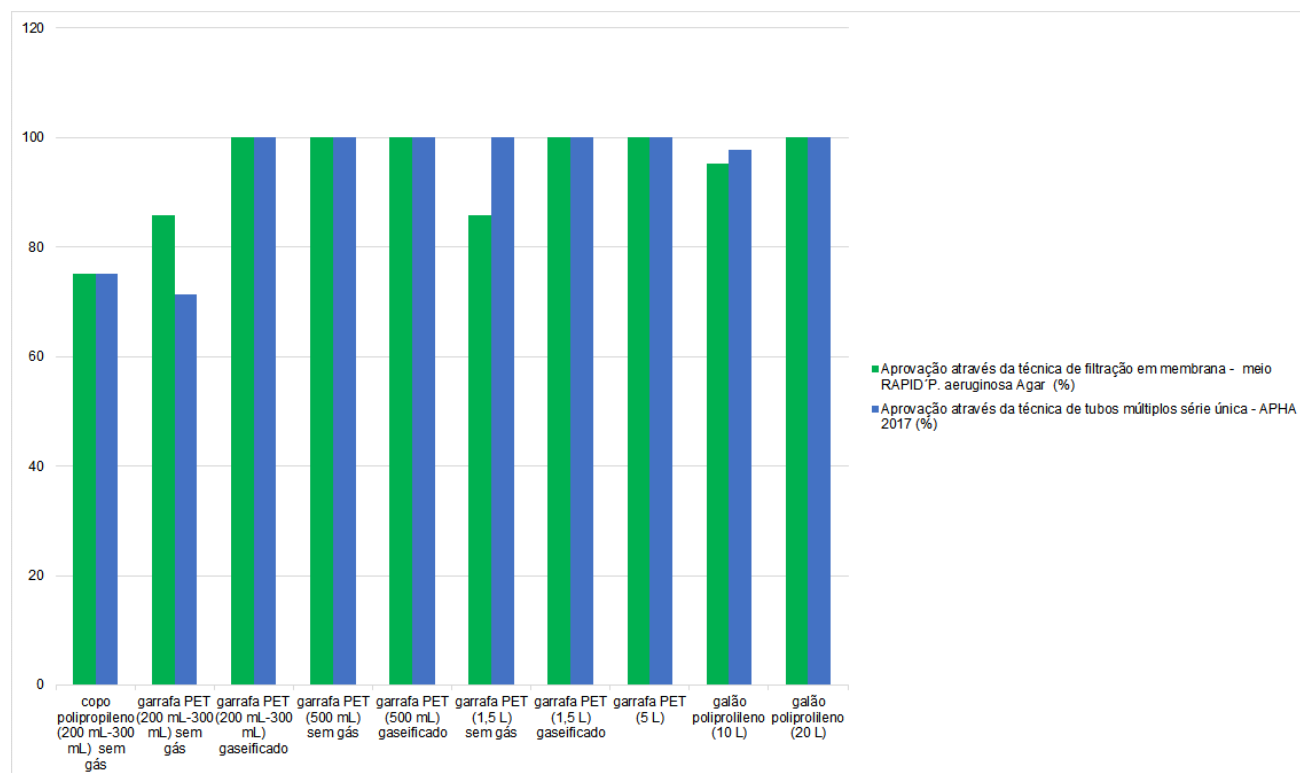


Figura 4. Percentual de amostras aprovadas por tipo de embalagem, para pesquisa de *P. aeruginosa*.

Noventa e cinco (93,1%) amostras e duas outras (2%) apresentaram, respectivamente, ausência e presença (em 100 mL) de *P. aeruginosa* através das duas metodologias utilizadas, evidenciando portanto, um grau de concordância (95,1%) relativamente grande entre as técnicas analíticas. Apenas quatro (3,9%) amostras apresentaram presença (em 100 mL) da bactéria através da técnica de filtração em membrana usando o meio cromogênico RAPID *P. aeruginosa* Agar®, mas que o método do NMP não detectou. E em somente uma amostra a *P. aeruginosa* foi evidenciada (em 100 mL) através do método do NMP, porém não pela técnica de filtração.

CONCLUSÃO

Considerando a legislação vigente, concluiu-se que, do ponto de vista microbiológico, seis (5,9%) amostras de água mineral (de um total de 102) avaliadas mostraram-se impróprias para o consumo humano, através da técnica de filtração em membrana utilizando o meio RAPID *P. aeruginosa* Agar®: Marca B - garrafa PET (1,5L) sem gás (2 unidades); Marca C - galão polipropileno retornável (10L) sem gás (2 unidades), Marca D - copo polipropileno (200mL-300mL) sem gás (1 unidade) e Marca D - garrafa PET (200mL-300mL) sem gás (1 unidade). Quatro (3,9%) amostras foram reprovadas para o consumo humano, através da técnica dos tubos múltiplos: marca D - copo



polipropileno (200mL-300mL) sem gás (1 unidade), marca D - garrafa PET (200mL-300mL) sem gás (2 unidades) e marca G - galão polipropileno retornável (10L) sem gás (1 unidade).

A presença de *P. aeruginosa* nas amostras indicou falha de boas práticas em algum ponto dentro da cadeia de envasamento de água mineral.

Em relação aos métodos analíticos utilizados, os resultados demonstraram que a técnica de filtração em membrana usando o meio cromogênico RAPID[®] *P. aeruginosa* Agar® mostrou-se uma alternativa adequada ao método de tubos múltiplos, conseguindo inclusive detectar quatro amostras positivas que o método do NMP não detectou.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, pela bolsa PIBIC concedida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIR. Águas minerais. Disponível em: <<https://abir.org.br/o-setor/dados/aguas-minerais>>. Acesso em 08 ago.2020.

ASSIRATI, D.M. Sumário Mineral 2014. DNPM.

BIO-RAD. **RAPID[®] *P. aeruginosa* Agar for water testing**: catálogo técnico. v2, 2014. Disponível em: <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/fsd/literature/TS_RAPID_PSA.pdf>. Acesso em: 26 jun.2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Resolução RDC nº 274, de 22 de setembro de 2005** (a). Aprova o Regulamento técnico para águas envasadas e gelo. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 23 set. 2005. Seção 1, p. 376.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Resolução RDC nº 275, de 22 de setembro de 2005** (b). Aprova o Regulamento técnico de características microbiológicas para água mineral natural e água natural. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 23 set. 2005. Seção 1, p. 377-378.

BRAUN-HOWLAND, E. & HUNT, M.E. Microbiological examination. In: BAIRD, R.B.; EATON, A.D & RICE, E.W. (eds.). Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater. 23rd ed. Washington, D.C.: American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA & Water Environment Federation (WEF), 2017. Parte 9000, seção 9230C, p. 9.119-9.122.

CASTRO, L. R. S.; CARVALHO, J. S.; VALE, V. L. C. **Avaliação microbiológica de diferentes marcas de água mineral**. Revista Baiana de Saúde Pública, Salvador, v. 34, n. 4, p. 835-844, 2010.

GOMES, A. F.T. **Implementação da ISO 16266 – Detecção e contagem de *Pseudomonas aeruginosa* em água de consumo por membrana de filtração**. 2017. Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar) – Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal, 2017.

GOMES, I. S.; BASTOS, J.; LEITE, C. C. **Perfil microbiológico de água de bebedouros de unidades de ensino da Universidade Federal da Bahia, campus Ondina**. Higiene Alimentar, São Paulo, v. 22, n. 1, p. 68-71, 2008.



MENDES, A. C. G.; MEDEIROS, K. R.; FARIAS, S. F.; LESSA, F. D.; CARVALHO, C. N.; DUARTE, P. O. **Sistema de informações hospitalares – fonte complementar na vigilância e monitoramento das doenças de veiculação hídrica.** Informe Epidemiológico do SUS, Brasília, v. 9, n. 2, p.111-124, 2000.

PORTO, M. A. L.; OLIVEIRA, A. M.; FAI, A. E. C.; STAMFORD, T. L. M. **Coliformes em água de abastecimento de lojas *fast-food* da Região Metropolitana de Recife (PE, Brasil).** Ciência & Saúde Coletiva, Rio de Janeiro, v. 16, n. 5, p. 2653-2658, 2011.

RITTER, A. C. & TONDO, E. C. **Avaliação microbiológica de água mineral natural e de tampas plásticas utilizadas em uma indústria da grande Porto Alegre/RS.** Alim. Nutr., Araraquara, v. 20, n. 2, p. 203-208, 2009.

ROSA, S. P.; SILVA, S. R. P.; MANN, M. B.; CORÇÃO, G. **Avaliação da presença de coliformes totais e fecais em amostras de água mineral comercializadas em Porto Alegre, RS.** Higiene Alimentar, São Paulo, v. 22, p. 94-99, 2008.

SABIONI, J. G. & SILVA, I. T. **Qualidade microbiológica de águas minerais comercializadas em Ouro Preto, MG.** Higiene Alimentar, São Paulo, v. 20, n. 143, p. 72-78, 2006.

SANTOS, M. G.; ALVES, M.; VEIGA, S. M. O. M. **Pesquisa de *Pseudomonas aeruginosa* em água mineral comercializada em Alfenas-MG.** Higiene Alimentar, São Paulo, v. 26, n. 210-211, p. 97-99, 2012.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; GOMES, R. A. R.; OKAZAKI, M. M. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água.** 5 ed. São Paulo: Blucher, 2017. 560 p. ISBN 978-85-212-1225-6.

VIEIRA, J. M. M.; LIMA, R.; RUFINO, L. R. A.; FIORINI, J. E.; OLIVEIRA, N. M. S. **Análise microbiológica da água de bebedouros de escolas municipais da cidade de Alfenas.** Higiene Alimentar, São Paulo, v. 25, n. 196-197, p. 115-118, 2011.