

## Comparação das técnicas do número mais provável (NMP) e de filtração em membrana na avaliação da qualidade microbiológica de água mineral natural

### Comparison of most probable number (MNP) and membrane filtration techniques for analyzing the natural mineral water microbiological quality

RIALA6/1429

Marcelo Luiz Lima BRANDÃO<sup>1,2\*</sup>, Carla de Oliveira ROSAS<sup>1</sup>, Valéria de Mello MEDEIROS<sup>1</sup>, Márcia Barbosa WARNKEN<sup>1</sup>, Silvia Maria Lopes BRICIO<sup>1</sup>, Ana Maria Luiz da SILVA<sup>3</sup>, Denise Rosane Perdomo AZEREDO<sup>2</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Laboratório de Microbiologia de Produtos, Setor de Alimentos, Departamento de Microbiologia, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Av. Brasil, 4365, Mangueiras, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, CEP 21040-900. Tel.: (21)3865-5161. E-mail: marcelo.brandao@incqs.fiocruz.br

<sup>2</sup>Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), Campus Rio de Janeiro

<sup>3</sup>Laboratório de Ensino e Pesquisa, Setor de Urinálise, Centro de Saúde Escola Germano Sinval Faria, Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz

Recebido: 05.05.2011 - Aceito para publicação: 15.02.2012

#### RESUMO

O consumo de água mineral tem sido associado a um estilo de vida saudável e à crença, por parte dos consumidores, de que esse produto é relativamente seguro. A RDC n. 275/05 determina os padrões microbiológicos para água mineral natural e água natural no Brasil. Este trabalho teve como objetivo comparar as técnicas de filtração em membrana e de número mais provável (NMP) pela avaliação da qualidade microbiológica de amostras de água mineral natural envasilhadas em garrafões de 20 litros, comercializadas no Município do Rio de Janeiro, Brasil. Das 31 amostras representativas (no total de 155 unidades amostrais) analisadas, 22 (70,97%) apresentaram-se insatisfatórias em virtude de ocorrência de coliformes termotolerantes em duas (6,45%) amostras, independentemente da técnica utilizada. A contagem de coliformes totais acima do limite especificado foi evidenciada em três amostras (9,68%), de enterococos em uma amostra (3,23%), de *P. aeruginosa* em 21 (67,74%) e de clostrídios sulfito redutores em duas amostras (6,46%). A técnica do NMP apresentou maior sensibilidade na detecção dos grupos de micro-organismos relacionados na resolução supracitada. Portanto, esta técnica demonstrou ser mais eficiente para executar o controle da qualidade microbiológica de água potável.

**Palavras-chave.** água mineral, qualidade microbiológica, filtração em membrana, número mais provável.

#### ABSTRACT

Mineral water consumption has been associated with a healthy lifestyle, and many consumers believe that this is a relatively safe product. In Brazil, the RDC no. 275/05 regulates the microbiological standards for mineral and natural waters. This study aimed at comparing the membrane filtration and the most probable number (MPN) techniques for analyzing the microbiological quality of natural mineral water samples bottled into 20-liter containers, commercialized in Rio de Janeiro, Brazil. Of 31 representative samples (a total of 155 units), 22 (70.97%) were unsatisfactory. Among these noncompliant samples, fecal coliforms were detected in two (6.45%). Total coliforms count above the established limit was observed in three samples (9.68%), being enterococci in one sample (3.23%); *P. aeruginosa* in 21 (67.74%) and sulfite-reducing clostridia in two (6.46%). The MPN technique showed highest sensitivity for detecting the microorganisms groups specified in the above mentioned regulation. Thus, the MPN technique proved to be mostly efficient and suitable for monitoring the microbiological quality of potable waters.

**Keywords.** mineral water, microbiological quality, membrane filtration, most probable number.

## INTRODUÇÃO

A água mineral natural é obtida diretamente de fontes naturais ou por extração de águas subterrâneas, caracterizada pelo conteúdo definido e constante de determinados sais minerais, oligoelementos e outros constituintes considerando-se as flutuações naturais<sup>1</sup>. Durante a penetração no solo, a água perde parte da carga bacteriana e matéria orgânica em suspensão. Ao emergir ou após captação, apresenta composição físico-química distinta, além de uma microbiota autóctone, em níveis baixos<sup>2</sup>. Os micro-organismos predominantes são bacilos Gram-negativos, como as bactérias dos gêneros *Pseudomonas*, *Flavobacterium* e *Moraxella/Acinetobacter*<sup>3</sup>.

O consumo de água mineral está associado a um estilo de vida saudável e à crença, por parte dos consumidores, de que se trata de um produto relativamente seguro<sup>4,5</sup>. O aumento do consumo deste produto no Brasil se deu principalmente pela insatisfação do consumidor com a água dos sistemas públicos de abastecimento e pela falta de suprimentos de água potável segura durante viagens<sup>4,6,7</sup>.

Com isso, a produção brasileira de água mineral envasada passou de 3,73 bilhões de litros em 2001 para 4,37 bilhões de litros em 2008. Neste mesmo ano, o Brasil foi o quarto consumidor mundial de águas engarrafadas<sup>8</sup>.

No Brasil, entre 1999 e 2008, foram notificados 343 surtos ocasionados por água contaminada, com a ocorrência de oito óbitos. Desses surtos, em 314 não houve especificação da origem da água, e outros 15 foram ocasionados devido ao consumo de água mineral<sup>9</sup>.

Água mineral natural não deve representar risco à saúde do consumidor<sup>10</sup>. Neste sentido, as esferas governamentais têm desenvolvido padrões de regulamentação para proteger a população de doenças de origem hídrica. Em 2005, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária publicou a RDC nº 275, que passou a determinar as características microbiológicas para água mineral natural e água natural. Este regulamento prevê, para amostras representativas, a ausência de *Escherichia coli* ou coliformes termotolerantes em cinco unidades amostrais e o limite de até 2,0 UFC/100 mL ou 2,2 NMP/100 mL em uma das cinco unidades para coliformes totais, enterococos, *Pseudomonas aeruginosa* e clostrídios sulfito redutores e/ou *Clostridium perfringens*<sup>10</sup>.

A RDC nº 275, de 22 de setembro de 2005, possibilita a utilização das técnicas de filtração em

membrana e do número mais provável (NMP) para a quantificação das bactérias citadas. As referidas técnicas são descritas no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*<sup>11</sup> e nas normas publicadas pela International Standardization Organization (ISO).

De acordo com o exposto, este trabalho teve como objetivo comparar duas técnicas de ensaio: a técnica de filtração em membrana e a técnica do NMP para os diferentes micro-organismos citados na legislação de água mineral, a partir da avaliação da qualidade microbiológica de amostras comercializadas em garrações de 20 litros no município do Rio de Janeiro. Os resultados obtidos neste estudo poderão indicar uma técnica mais sensível para a análise microbiológica de água mineral natural segundo os parâmetros legais.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostragem

Foram analisadas 31 amostras representativas de água mineral natural, não gaseificadas, comercializadas em garrações retornáveis de 20 litros, de 15 marcas distintas (codificadas pelas letras “A” até “O”), entre os meses de abril a dezembro de 2006, segundo os critérios preconizados pela RDC nº 275, de 22 de setembro de 2005<sup>10</sup>. Foram analisadas 7 amostras da marca “A”, 4 da marca “B”, 2 das marcas “C, D, E, F, H, J e L” e 1 das marcas “G, I, K, M, N e O”. A escolha das marcas foi de acordo com a disponibilidade no comércio do município do Rio de Janeiro durante o período de análises. Cada amostra era composta de 5 garrações com a mesma data de envase, sendo considerados do mesmo lote, perfazendo um total de 155 garrações. As análises foram realizadas no Setor de Alimentos do Departamento de Microbiologia do Instituto Nacional de Controle e Qualidade em Saúde – INCQS/Fiocruz.

### Análises microbiológicas

Para cada grupo de micro-organismos, foram realizados ensaios utilizando as técnicas de filtração em membrana e NMP. Os ensaios de enumeração de coliformes totais, coliformes termotolerantes, enterococos e *Pseudomonas aeruginosa* foram realizados segundo a descrição no *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2005)<sup>11</sup>. A contagem de clostrídios sulfito redutores foi realizada de acordo com a norma ISO 6461:1986<sup>12</sup>.

### Enumeração pela técnica de filtração em membrana

Alíquotas de 100 mL de cada unidade amostral foram filtradas em sistema de filtração (Millipore) utilizando membrana estéril de acetato de celulose com 47 mm de diâmetro e 0,45 µm de porosidade. Após a filtração, cada membrana foi transferida para a superfície do meio de cultura sólido específico para cada micro-organismo citado. Para coliformes totais e termotolerantes, foi utilizado o ágar *M-Endo* (Difco), incubado a 35 ± 0,5 °C por 24 horas. As colônias características foram semeadas em caldo verde brilhante bile 2% lactose (VBBL-Merck), incubados a 35 ± 0,5 °C por 48 horas e em caldo EC (Merck), incubados em banho-maria a 44,5 ± 0,2 °C por 24 horas, para a confirmação de coliformes totais e termotolerantes, respectivamente. Os resultados foram expressos em número de unidades formadoras de colônias (UFC) em 100 mL, conforme o cálculo:  $C = \sum_i (Z_i * K_i / n_i)$ , onde: C = concentração de células em UFC/mL;  $Z_i$  = contagem das colônias separadas por características;  $K_i$  = total de colônias confirmadas de cada grupo característico;  $n_i$  = total de colônias testadas de cada grupo característico.

Para a contagem de enterococos, foi utilizado o ágar *mE* (Difco) incubado a 41 ± 0,5 °C por 48 horas. Após o período de incubação, a membrana foi transferida para uma placa contendo meio EIA, incubado a 41 ± 0,5 °C por 20 minutos. As colônias características foram submetidas aos testes de produção de catalase, coloração de Gram, utilização da esculina (Merck) e crescimento em caldo infusão cérebro-coração (BHI) com 6,5% de NaCl (Merck) a 45 ± 2 °C. O resultado foi expresso em número de UFC em 100 mL.

Para a enumeração de *P. aeruginosa*, foi utilizado o ágar M-PA (Difco) incubado a 41,5 ± 0,5 °C por 72 horas. As colônias características foram semeadas em ágar Milk (Difco) e incubadas a 35 ± 2 °C por 24 horas. O resultado foi expresso em número de UFC em 100 mL conforme o cálculo descrito anteriormente.

Para clostrídios sulfito redutores, foi utilizado o ágar sulfito-ferro (Merck) incubado a 37 ± 1 °C por 48 horas em atmosfera de anaerobiose com uso de gerador específico para este fim (Merck). Foram selecionadas para contagem as colônias negras. O resultado foi expresso como número de UFC de clostrídios sulfito redutores em 100 mL.

### Técnica de NMP

Foram semeadas alíquotas de 10 mL de cada unidade amostral em 10 tubos contendo 10 mL de caldo

específico, em dupla concentração, para cada micro-organismo.

Para o teste presuntivo de coliformes, foi utilizado o caldo Lauril Sulfato Triptose (Merck), incubado a 35 ± 2 °C por 48 horas. Os testes confirmatórios foram realizados da mesma forma que na técnica de filtração em membrana. O número de coliformes totais e termotolerantes foram obtidos na tabela de NMP, baseado no número de tubos positivos do caldo VBBL e de caldo EC respectivamente, sendo os resultados expressos em NMP/100 mL.

Para enterococos, foi utilizado o caldo azida dextrose (Difco), incubado a 35 ± 2 °C por 48 horas. Os tubos que apresentaram crescimento foram semeados, pela técnica de esgotamento, em ágar PSE (Difco). As placas foram incubadas a 35 ± 2 °C por 24 horas. A confirmação da presença de enterococos foi realizada com as mesmas provas descritas na técnica de filtração em membrana. O resultado foi expresso em NMP/100 mL, baseado no número de tubos de caldo azida dextrose que apresentaram resultado positivo nos ensaios confirmatórios.

Para o NMP de *P. aeruginosa*, foi utilizado o caldo asparagina, preparado por formulação<sup>11</sup>, incubado a 35 ± 2 °C. Após 48 horas de incubação, os tubos foram avaliados em aparelho gerador de luz ultravioleta a 365 nm (Spectroline<sup>®</sup>, Westbury, Nova York, EUA). Os tubos que apresentaram produção de pigmento fluorescente foram submetidos ao teste confirmatório em caldo acetamida, preparado por formulação<sup>11</sup>, incubado a 35 ± 2 °C por 36 horas. O resultado foi expresso em NMP/100 mL conforme o número de tubos positivos que foram confirmados no caldo acetamida.

O NMP para clostrídios sulfito redutores foi realizado a partir da semeadura em caldo *differential reinforced clostridial medium* (DRCM) (Fluka). Os tubos foram incubados a 37 ± 1 °C em atmosfera de anaerobiose. Após o período de 48 horas, foram considerados positivos os tubos que apresentaram escurecimento do meio. O resultado foi expresso em NMP/100 mL, baseado no número de tubos positivos.

### Avaliação da sensibilidade

Os resultados obtidos pelas técnicas de filtração em membrana e NMP na detecção de cada grupo de micro-organismo foram avaliados em relação a sua sensibilidade, como proposto por Greenhalgh<sup>13</sup>. Nesta avaliação, os resultados positivos obtidos por unidade

amostral em cada uma das técnicas empregadas foram considerados como resultados verdadeiros positivos.

O resultado da sensibilidade em percentual foi determinado conforme o cálculo:

$S(\%) = a / (a+b) \times 100$ , onde: S = sensibilidade em percentual; a = verdadeiros positivos; b = falso negativos.

## RESULTADOS

De 31 amostras analisadas, 22 (70,97%) apresentaram qualidade microbiológica insatisfatória e 4 (12,90%), qualidade microbiológica marginal, segundo os critérios da RDC n. 275/05<sup>10</sup> (Tabela 1). Em relação às marcas analisadas, 7 (D, E, I, K, L, M e N) estavam em desacordo em 100% das amostras; 1 (A), em 85,71%; e 5 (B, C, F, H e J), em 50% das amostras. As marcas G e O e 1 amostra das marcas H e J apresentaram qualidade marginal, ou seja, apenas uma unidade amostral revelou-se entre os limites inferior (< 1,0 UFC ou 1,1 NMP) e superior (2,0 UFC ou 2,2 NMP) estabelecidos na RDC nº 275/05<sup>10</sup> (Tabela 1).

A Tabela 2 apresenta a caracterização das amostras de diferentes marcas de água mineral natural segundo os parâmetros microbiológicos da RDC n. 275/05<sup>10</sup>. Foram consideradas insatisfatórias as amostras que apresentaram resultados acima dos limites estabelecidos na legislação supracitada em pelo menos uma das técnicas utilizadas. Duas amostras foram insatisfatórias (6,45%) devido à presença de coliformes termotolerantes, sendo uma analisada pela técnica do NMP e outra por filtração em membrana, porém com ausência de *E. coli* em ambas. Três amostras (9,68%) apresentaram contagem acima do limite especificado para coliformes totais pela técnica do NMP, e, destas, apenas uma foi detectada por filtração em membrana. Uma amostra (3,23%) foi insatisfatória devido a enterococos detectados apenas por filtração em membrana. Um total de 21 amostras (67,74%) apresentou contagem acima do limite especificado para *P. aeruginosa*, 17 (54,84%) pela técnica do NMP e 16 (51,61%) por filtração em membrana. Duas amostras (6,46%) foram insatisfatórias devido a clostrídios sulfito redutores, detectados apenas pela técnica do NMP (Tabela 2).

Quanto ao desempenho das técnicas utilizadas, a filtração em membrana apresentou menor sensibilidade em relação à técnica de NMP na enumeração de coliformes totais, *P. aeruginosa*, enterococos e clostrídios sulfito redutores; e igual sensibilidade na detecção de coliformes termotolerantes (Tabela 3). A sensibilidade

da técnica de NMP foi duas vezes maior que a da técnica de filtração em membrana na quantificação de coliformes totais e clostrídios sulfito redutores, e quatro vezes maior na quantificação de enterococos (Tabela 3). A sensibilidade da técnica de NMP para *P. aeruginosa* (71,2%) também foi maior que a da técnica de filtração em membrana (64,4%) (Tabela 3).

A Tabela 4 apresenta os micro-organismos detectados nas amostras de água mineral natural, analisadas pelas técnicas do NMP e/ou filtração em membrana. As demais unidades amostrais apresentaram resultado “< 1,1 NMP/100 mL” e “Ausência” ou “< 1,0 UFC/mL”.

## DISCUSSÃO

A presença de coliformes, que podem ocorrer naturalmente em solos, águas e vegetais, indica a possível contaminação por fontes aéreas, infiltração do solo com águas pluviais ou contato do produto com superfícies que não foram sanificadas corretamente devido a falhas nas Boas Práticas de Fabricação (BPF)<sup>3</sup>. Os coliformes termotolerantes, quando presentes, apontam deficiência higiênico-sanitária e possível presença de patógenos<sup>3</sup>.

Os resultados obtidos neste estudo apontam para a importância do contínuo controle da qualidade microbiológica desses produtos. Das amostras analisadas, 5 (A2, A6, A7, D2 e J2) (16,13%) apresentaram-se contaminadas por coliformes totais, sendo que 2 destas (A2 e J2) (6,45%) estavam contaminadas com coliformes termotolerantes. O resultado encontrado foi similar ao de outros autores que avaliaram a qualidade microbiológica de água mineral comercializada em garrafas de 20 litros. Silva et al.<sup>14</sup>, ao analisarem 22 amostras, encontraram coliformes totais em 5 (22,7%) e coliformes termotolerantes em 1 amostra (4,5%). Farache Filho e Dias<sup>15</sup>, em 84 amostras analisadas, encontraram coliformes totais e termotolerantes em 13 (15,5%) e em 2 amostras (2,4%), respectivamente. Coelho et al.<sup>16</sup> verificaram que, de 120 amostras analisadas, 46 (38,33%) apresentavam coliformes totais acima dos limites permitidos na legislação vigente, enquanto 12 (10%) estavam insatisfatórias devido à presença de coliformes termotolerantes.

Os enterococos, quando presentes, podem indicar contaminação fecal recente. Estas bactérias têm sido utilizadas junto com os coliformes termotolerantes para diferenciar a contaminação de origem fecal de humanos

**Tabela 1.** Caracterização microbiológica de amostras de água mineral natural envasadas em garrações de 20 lL, segundo a RDC nº 275/05 – ANVISA/MS

Marca e n. da amostra	Qualidade satisfatória (%)	Qualidade insatisfatória (%)	Qualidade marginal (%)
A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7	A1 (14,29%)	A2, A3, A4, A5, A6, A7 (85,71%)	- <sup>a</sup>
B1, B2, B3, B4	B1, B2 (50%)	B3, B4 (50%)	-
C1, C2	C1 (50%)	C2 (50%)	-
D1, D2	-	D1, D2 (100%)	-
E1, E2	-	E1, E2 (100%)	-
F1, F2	F1 (50%)	F2 (50%)	-
G	-	-	G (100%)
H1, H2	-	H2 (50%)	H1 (50%)
I	-	I (100%)	-
J1, J2	-	J2 (50%)	J1 (50%)
K	-	K (100%)	-
L1, L2	-	L1, L2 (100%)	-
M	-	M (100%)	-
N	-	N (100%)	-
O	-	-	O (100%)
Total (n = 31)	5 (16,13%)	22 (70,97%)	4 (12,90%)

<sup>a</sup>- não detectada.

**Tabela 2.** Caracterização microbiológica de amostras de água mineral natural segundo os parâmetros estabelecidos na RDC nº 275/05 – ANVISA/MS, analisadas pelas técnicas do número mais provável (NMP) e filtração em membrana (FM)

Micro-organismos	Técnica de análise	N. de amostras com qualidade satisfatória	N. de amostras com qualidade insatisfatória [identificação](%)	N. de amostras com qualidade marginal [identificação](%)
Coliformes termotolerantes	NMP <sup>a</sup>	30	1 [A2] (3,23%)	N.A. <sup>c</sup>
	FM <sup>b</sup>	30	1 [J2] (3,23%)	
Coliformes totais	NMP	27	3 [A6, A7, D2] (9,68%)	1 [A2] (3,23%)
	FM	29	1 [A6] (3,23%)	1 [J2] (3,23%)
Enterococos	NMP	27	- <sup>d</sup>	4 [B3, D2, L2, J2] (12,90%)
	FM	30	1 [D2] (3,23%)	-
<i>P. aeruginosa</i>	NMP	13	17 [A2, A3, A5, A6, A7, B3, B4, D1, D2, E2, H2, I, K, L1, L2, M, N] (54,84%)	1 [H1] (3,23%)
	FM	14	16 [A3, A4, A5, A6, A7, C2, D1, D2, E1, E2, F2, I, K, L2, M, N] (51,61%)	1 [O] (3,23%)
Clostrídios sulfito redutores	NMP	25	2 [E1, F2] (6,46%)	4 [D2, E2, G, K] (12,90%)
	FM	27	-	4 [E2, G, J1, K] (12,90%)

<sup>a</sup>- número mais provável; <sup>b</sup>- filtração em membrana; <sup>c</sup>- não se aplica; <sup>d</sup>- não detectada.

**Tabela 3.** Sensibilidade das técnicas de filtração em membrana e número mais provável na detecção de cada grupo de micro-organismo em amostras de água mineral natural

Técnica		Coliformes termotolerantes	Coliformes totais	<i>P. aeruginosa</i>	Enterococos	Clostrídios sulfito redutores
Filtração em membrana	Verdadeiro Positivo <sup>a</sup>	1	2	38	1	4
	Falso Negativo <sup>b</sup>	1	3	21	3	8
	Total	2	5	59	4	12
$S = a/(a+b) \times 100$		S = 50,0%	S = 40,0%	S = 64,4%	S = 25,0%	S = 33,3%
Número mais provável	Verdadeiro positivo <sup>a</sup>	1	4	42	4	8
	Falso negativo <sup>b</sup>	1	1	17	0	4
	Total	2	5	59	4	12
$S = a/(a+b) \times 100$		S = 50,0%	S = 80,0%	S = 71,2%	S = 100,0%	S = 66,7%

a= número de verdadeiro positivos; b= número de falso negativos; S= sensibilidade

**Tabela 4.** Carga microbiana detectada em amostras de água mineral natural (20 L), pelas técnicas do número mais provável e/ou filtração em membrana, conforme RDC n. 275/05 – ANVISA/MS

Amostra	Unidade analítica	Número mais provável (NMP/100 mL)	Filtração em membrana (UFC/100 mL)
<b>Coliformes totais</b>			
A2	2	2,2	< 1,0
A6	4	> 23	> 300
A7	5	3,6	< 1,0
D2	1	3,6	< 1,0
J2	1	< 1,1	2,0
<b>Coliformes termotolerantes</b>			
A2	2	1,1	Ausência
J2	1	< 1,1	2,0
<b><i>Pseudomonas aeruginosa</i></b>			
A2	4	5,1	< 1,0
	5	> 23	< 1,0
	1	< 1,1	3,0
	2	1,1	< 1,0
A3	3	2,2	< 1,0
	4	< 1,1	5,0
	5	2,2	< 1,0
A4	3	< 1,1	4,0
	5	< 1,1	5,0
A5	2	9,2	137
	3	2,2	13
	4	5,1	11
	5	< 1,1	72
A6	1	2,2	3,0
	2	23	< 1,0
	3	9,2	< 1,0
A7	1	5,1	34
	2	> 23	> 300
	3	2,2	> 300
	5	< 1,1	272
B3	4	3,6	< 1,0
	3	12	< 1,0
B4	4	1,1	< 1,0
	5	12	< 1,0
C2	1	< 1,1	24
	4	< 1,1	18
	3	1,1	41
D1	4	1,1	> 300
	5	3,6	< 1,0
	1	> 23	< 1,0
D2	4	< 1,1	4,0
	5	< 1,1	5,0
E1	4	< 1,1	8,0
E2	3	2,2	124
	5	16,1	160

  

Amostra	Unidade analítica	Número mais provável (NMP/100 mL)	Filtração em membrana (UFC/100 mL)
F2	5	< 1,1	3,0
H1	5	2,2	< 1,0
H2	4	1,1	< 1,0
	5	1,1	< 1,0
I	1	2,2	11
	2	< 1,1	58
	4	> 23	93
	5	> 23	93
K	1	16,1	100
	4	2,2	< 1,0
	5	23	< 1,0
L1	1	1,1	< 1,0
	4	1,1	< 1,0
	3	> 23	48
L2	4	1,1	5,0
	5	> 23	50
M	4	> 23	118
	5	> 23	< 1,0
	1	2,2	19
	2	< 1,1	14
N	3	< 1,1	15
	4	< 1,1	31
	5	23	35
O	3	< 1,1	1,0
<b><i>Enterococcus</i></b>			
B3	5	2,2	< 1,0
D2	1	1,1	5,0
J2	5	2,2	< 1,0
L2	5	2,2	< 1,0
<b>Clostrídios sulfíto redutores</b>			
D2	2	1,1	< 1,0
	1	2,2	< 1,0
E1	3	3,6	< 1,0
	5	2,2	< 1,0
E2	1	1,1	< 1,0
	5	< 1,1	2,0
F2	2	16,1	< 1,0
G	1	1,1	< 1,0
	5	< 1,1	2,0
J1	5	< 1,1	2,0
K	4	2,2	< 1,0
	5	< 1,1	2,0

com a de outros animais de sangue quente<sup>11</sup>. Bactérias do grupo enterococos foram detectadas em 4 amostras (B3, D2, J2 e L2) (12,90%), sendo que apenas a amostra D2 apresentou valores acima do limite permitido pela RDC n. 275/05<sup>10</sup> (Tabela 2). Este resultado foi semelhante ao relatado por Silva et al.<sup>14</sup>, que, ao analisarem 22 amostras, encontraram estreptococos fecais em apenas uma (4,5%). Já Ritter e Tondo<sup>5</sup>, ao analisarem 15 amostras de garrações de 20 L de uma indústria localizada na Cidade de Novo Hamburgo-RS, não detectaram enterococos.

Os esporos de clostrídios estão amplamente distribuídos no ambiente, podendo estar presentes em material fecal de seres humanos e animais, em água residuária e no solo. Diferentemente das bactérias do grupo coliforme, os esporos sobrevivem na água por longos períodos, por serem mais resistentes que as formas vegetativas à ação de fatores químicos e físicos, sugerindo contaminação fecal remota<sup>12</sup>. Esporos de clostrídios sulfito redutores foram encontrados em 7 amostras (D2, E1, E2, F2, G, J1 e K) (22,58%), sendo que apenas 2 (E1 e F2) (6,46%) apresentaram-se fora dos padrões descritos na legislação<sup>10</sup> (Tabela 2). Outros autores obtiveram resultados inferiores. Silva et al.<sup>14</sup> não detectaram clostrídios sulfito redutores em 22 amostras analisadas. Ritter e Tondo<sup>5</sup>, ao analisarem 15 amostras de garrações de 20 L de uma indústria localizada no município de Novo Hamburgo-RS, não detectaram clostrídios sulfito redutores.

O elevado índice de amostras contendo *P. aeruginosa* acima dos limites permitidos (67,74%) revela o risco do consumo desses produtos. Outros autores já relataram contaminação por *P. aeruginosa* neste mesmo tipo de produto. Silva et al.<sup>14</sup>, ao analisarem 22 amostras, encontraram *P. aeruginosa* em 11 (50%). Farache Filho e Dias<sup>15</sup> constataram que, de 84 amostras analisadas, 8 (9,5%) apresentavam contaminação por *P. aeruginosa* acima dos limites estabelecidos na RDC n. 275/05<sup>10</sup>. Coelho et al.<sup>16</sup>, ao analisarem 120 amostras, encontraram 22 (18,33%) contaminadas com *P. aeruginosa*.

*Pseudomonas aeruginosa* é considerado um micro-organismo oportunista, podendo apresentar capacidade invasiva e toxigênica, com grande potencial de desenvolvimento de múltipla resistência aos agentes antimicrobianos. O consumo de água mineral contaminada com *P. aeruginosa* pode representar risco para determinados grupos com maior suscetibilidade a infecções, como crianças, idosos e imunosuprimidos<sup>17</sup>.

A característica de encapsulamento por *P. aeruginosa* lhe confere a capacidade de formar biofilmes

em equipamentos e embalagens plásticas<sup>17</sup>. Sua presença nas amostras analisadas sugere provável contaminação durante o engarrafamento e o armazenamento, visto que as embalagens são reutilizáveis, podendo, assim, contribuir em parte na carga microbiana do produto final, principalmente quando as etapas de lavagem e desinfecção são deficientes<sup>16</sup>. Dessa forma, água mineral em garração reutilizável de 20 litros apresenta maior risco de contaminação<sup>15</sup>.

As embalagens plásticas retornáveis devem ser submetidas a pré-lavagem antes da etapa de higienização automática (limpeza e desinfecção)<sup>1</sup>. A higienização dessas embalagens tem sido um fator preocupante na indústria de águas envasadas<sup>5</sup>. Neste contexto, o Departamento Nacional de Produção Mineral (DNPM) publicou a Portaria n. 358, de 21 de setembro de 2009<sup>18</sup>, que disciplina o prazo de validade de embalagens reutilizáveis de 10 e 20 litros, que passou a ser de três anos, prazo no qual a embalagem suporta os desgastes decorrentes de sua manutenção e transporte.

Em relação às técnicas analíticas empregadas na rotina de análises, a técnica de filtração em membrana é altamente reprodutível; pode ser utilizada para análise de grandes volumes de amostra, no caso de amostras suspeitas de apresentarem agrupamentos celulares bacterianos, e geralmente necessita de um tempo de análise menor que o procedimento de NMP. O limite de detecção desta técnica é de 1,0 UFC por volume inoculado, sendo indicada para amostras com contagens abaixo do limite de detecção por outros procedimentos<sup>11</sup>.

A técnica de NMP é um método estatístico, e os resultados são geralmente mais elevados que os provenientes de contagens em placas. Mesmo esta técnica não sendo muito precisa, ela permite uma melhor recuperação de micro-organismos pelo uso de meios líquidos seletivos ou diferenciais<sup>19</sup>. Os dados obtidos corroboram essa afirmativa, pois neste estudo foi observada maior sensibilidade da técnica na enumeração de coliformes totais, *P. aeruginosa*, enterococos e clostrídios sulfito redutores em relação à técnica de filtração em membrana.

## CONCLUSÃO

A técnica do NMP apresentou maior sensibilidade do que a técnica de filtração por membrana para quatro dos grupos de micro-organismos (coliformes totais, enterococos, *P. aeruginosa* e clostrídios sulfito redutores)

relacionados na RDC n. 275/05<sup>10</sup> e igual sensibilidade na detecção de coliformes termotolerantes. Sendo assim, esta técnica demonstrou ser mais eficiente para o controle da qualidade microbiológica de água mineral natural.

O estudo apresentou um elevado índice de amostras com qualidade insatisfatória (70,97%). Dentre estas, 21 (67,74%) foram devido à presença de *P. aeruginosa*. Atenção deve ser dada à reutilização dos garrafões de 20 litros, que, quando não higienizados de forma correta, podem acarretar contaminação bacteriana e facilitar a formação de biofilmes por *P. aeruginosa*.

Considerando-se o alto consumo de água mineral natural, ações de monitoramento devem ser adotadas a fim de garantir produtos seguros ao consumidor.

## REFERÊNCIAS

1. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC n. 173, de 13 de setembro de 2006. Dispõe sobre o Regulamento Técnico de Boas Práticas para Industrialização e Comercialização de Água Mineral Natural e Água Mineral. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, v. 178, 15 set 2006, Seção 1, p. 60.
2. Hiluy DJ, Perdigo GO, Aragao MAP, Peixoto TJ. Avaliação da qualidade microbiológica de águas minerais comercializadas em Fortaleza. *Hig Aliment*. 1994;8(33):17.
3. Kim H, Feng P. Bottled water. *In*: Downes FP, Ito K, organizadores. *Compendium of Methods for the Examination of Foods*. 4. ed. Washington: APHA; 2001. p. 573-6.
4. Jeena MI, Deepa P, Mujeeb Rahiman KM, Shanthi RT, Hatha AAM. Risk assessment of heterotrophic bacteria from bottled drinking water sold in Indian markets. *Int J Hyg Environ Health*. 2006;(209):191-6.
5. Ritter AC, Tondo EC. Avaliação microbiológica de água mineral natural e de tampas plásticas utilizadas em uma indústria da Grande Porto Alegre/RS. *Alim Nutr, Araraquara*. 2009;20(2):203-8.
6. Coelho DA, Silva PMF, Veiga SMOM, Fiorini J. E. Avaliação da qualidade microbiológica de águas minerais comercializadas em supermercados da cidade de Alfenas, MG. *Hig Aliment*. 2007;21(151):88-92.
7. Cardoso CC, Veiga SMOM, Nascimento LC, Fiorini JE, Amaral LA. Avaliação microbiológica de um processo de sanificação de galões de água com a utilização do ozônio. *Cienc Tecnol Aliment*. 2003;23(1):59-61.
8. Brasil. Ministério de Minas e Energia. Departamento Nacional de Produção Mineral. Fonseca DS. Água mineral. *In*: Rodrigues AFS, coordenador. *Economia mineral no Brasil*. Brasília: DNPM; 2009. p. 719-30. Disponível em: [http://www.dnpm.gov.br/conteudo.asp?IDSecao=68&IDPagina=1461].
9. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. Surtos de DTA ocasionados por água. [acesso 2010 out 16]. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/surtos\_agua\_10.pdf].
10. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC n. 275, de 22 de setembro de 2005. Regulamento Técnico de Características Microbiológicas para Água Mineral Natural e Água Natural. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, v. 184, 23 set 2005, Seção 1, p. 377.
11. Eaton AD, Clesceri LS, Rice EW, Greenberg AE, organizadores. *Standard Methods For the Examination of Water and Wastewater*, 21. ed. Washington: APHA; 2005.
12. International Organization for Standardization – ISO. Norma ISO 6461 – Water Quality – Detection and enumeration of the spores of sulfite-reducing anaerobes (clostridia): Part 1 – Method by enrichment in a liquid medium; Part 2 – Method by membrane filtration, 1. ed. 1986.
13. Greenhalgh, T. How to Read a Paper – Papers That Report Diagnostic or Screening Tests. *BMJ*. 1997;315(7107):540-3.
14. Silva MEZ, Santana RG, Guilhermetti M, Camargo Filho I, Endo EH, Ueda-Nakamura T, et al. Comparison of the bacteriological quality of tap water and bottled mineral water. *Int J Hyg Environ Health*. 2008;(211):504-9.
15. Farache Filho A, Dias MFF. Qualidade microbiológica de águas minerais em galões de 20 litros. *Alim Nutr, Araraquara*. 2008;19(3):243-8.
16. Coelho MIS, Mendes ES, Cruz MCS, Bezerra SS, Silva RPP. E. Avaliação da qualidade microbiológica de águas minerais consumidas na região metropolitana de Recife, estado de Pernambuco. *Acta Sci, Health Sci*. 2010;32(1):1-8.
17. Lincopan N, Trabuasi LR. *Pseudomonas aeruginosa*. *In*: Trabuasi LR, Alterthum F, editores. *Microbiologia*. São Paulo: Atheneu; 2005. p. 359-68
18. Brasil. Ministério de Minas e Energia. Departamento Nacional de Produção Mineral. Portaria n. 358, de 21 de setembro de 2009. Altera a Portaria n. 387, de 19 de setembro de 2008. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, v. 181, 22 set 2009, Seção 1, p. 51.
19. Jay MJ. Métodos de Cultura, Microscopia e Amostragem. *In*: JAY MJ. *Microbiologia de alimentos*. Porto Alegre: Artmed; 2005. p. 199-221.