

VARIAÇÃO DA MICROBIOTA NATURAL E DE *Pseudomonas aeruginosa* EM ÁGUA MINERAL NÃO CARBONATADA EMBALADA EM DIFERENTES MATERIAIS DURANTE O ARMAZENAMENTO A 30°C ± 1°C

EIROA, Mirtha Nelly Uboldi²; JUNQUEIRA, Valéria Christina Amstalden²;
SILVEIRA, Neliane Ferraz Arruda²

RESUMO

Garrafas de PVC, polipropileno e vidro adequadamente limpas e sanitizadas foram enxaguadas e enchidas com água mineral de uma fonte localizada no município de Lindóia-SP, e a seguir armazenadas a 30°C ± 1°C. Foram enumerados os microrganismos heterotróficos totais nos meios Ágar Padrão para Contagem e Ágar R2A imediatamente após engarrafamento. A variação da contaminação foi seguida através de exames periódicos. A variação da população de *Pseudomonas aeruginosa* foi estudada inoculando garrafas contendo água mineral com uma suspensão de *P. aeruginosa* ATCC 10145 de maneira a se obter uma contaminação de aproximadamente 10² UFC/ml. A população da bactéria foi avaliada periodicamente durante o tempo de armazenamento usando o meio Ágar *Pseudomonas* P. Houve aumento da população dos microrganismos heterotróficos totais nos primeiros 30 dias de armazenamento para depois diminuir de maneira irregular e ficar aproximadamente constante até completar 6 meses de observação. As contagens de *P. aeruginosa* aumentaram sensivelmente nas 2 primeiras semanas de estocagem diminuindo ligeiramente a seguir até atingir níveis próximos ao inicial. Não foram constatadas diferenças entre os 3 tipos de materiais de embalagem comparados.

Palavras chave: *Pseudomonas aeruginosa*, água mineral.

SUMMARY

NATURAL MICROFLORA AND *Pseudomonas aeruginosa* IN NON CARBONATED MINERAL WATER BOTTLED IN DIFFERENT MATERIALS DURING STORAGE AT 30°C ± 1°C. PVC, polypropylene and glass bottles properly cleaned and sanitized were rinsed with mineral water from a spring located in Lindóia, São Paulo State. Immediately after the bottling of the water, total heterotrophic microorganisms were counted in Plate Count Agar and R2A agar. The evolution of the contamination was followed through periodical examination. The changes of the population of *Pseudomonas aeruginosa* was studied by inoculation of the bottles with a suspension of *P. aeruginosa* ATCC 10145 in order to get a contamination of approximately 10² UFC/ml. The population of the bacteria was periodically evaluated during the storage time employing *Pseudomonas* P agar for counting. It was observed increasing of the population of heterotrophic microorganisms during the first 30 days of storage followed by lowering in an irregular manner. Then, the population remained approximately constant up to 6 months of observation. *P. aeruginosa* counts increased by during the 2 first weeks of storage followed by slight decrease until reaching levels similar to the initial counts. There were not differences when comparing the three types packaging material.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, mineral water.

¹ Recebido para publicação em 07/10/96. Aceito para publicação em 14/5/97.

² Pesquisadores Científicos do Instituto de Tecnologia de Alimentos. ITAL, Caixa Postal, 139 - CEP 13073-001 - Campinas-SP.

1 — INTRODUÇÃO

De acordo com alguns pesquisadores as bactérias autóctones da água mineral podem sobreviver nesta, após a embalagem, durante longos períodos de tempo (3) e, segundo algumas observações, após o engarrafamento começa uma rápida multiplicação das mesmas que atingem uma população máxima por volta de 1 a 2 semanas. O desenvolvimento microbiano caracteriza-se por uma alternância de aumentos e diminuições da população, cuja razão não se conhece exatamente. Para explicar o fato existem algumas teorias que consideram que cada nova população é composta de várias espécies que se desenvolvem às expensas da matéria orgânica das células mortas da população anterior (9). O aumento inicial da microbiota autóctone pode ser devido ao incremento na concentração de oxigênio dissolvido durante as operações de engarrafamento, à permeabilidade das embalagens plásticas ao oxigênio e talvez à migração de monômeros do material da embalagem, concentrando-se compostos orgânicos nas paredes dos recipientes (10). Porém cabe destacar que em geral considera-se que quando há migração de monômeros do recipiente para o alimento nele contido, isto acontece de uma vez e logo após a embalagem da água.

Algumas pesquisas apontam que as populações de microrganismos autóctones são mais elevadas na água mineral embalada em garrafas plásticas de PVC do que a embalada em garrafas clássicas de vidro, existindo a hipótese de que os ftalatos presentes nas garrafas plásticas poderiam estimular o desenvolvimento microbiano (3, 16). Segundo BUTTIAUX & BOUDIER (2) a multiplicação microbiana é mais intensa em águas com elevado conteúdo de minerais. SCHWALLER & SCHMIDT-LORENZ (15) estudaram quatro marcas comerciais de águas minerais francesas, carbonatadas e não carbonatadas e constataram populações de microrganismos totais de 1,5 x 10⁵ e 6,0 x 10⁴ UFC/ml após uma semana e 3 semanas de engarrafamento, respectivamente. Em águas carbonatadas e em águas não carbonatadas foram evidenciadas populações da ordem de 3,6 x 10⁴ a 2,6 x 10⁵ UFC/ml após 1 semana de engarrafamento, e de 1,8 x 10⁴ a 8,5 x 10⁴ após 3 semanas respectivamente. MORAIS & COSTA (13) estudaram o desenvolvimento da microbiota de águas minerais, em Coimbra (Portugal), em garrafas de PVC armazenadas em temperatura ambiente durante 360 dias e isolaram 316 cepas de *Pseudomonas*. CANTONI *et al* (3) estudaram a evolução da população microbiana em águas minerais embaladas em garrafas de PVC e em garrafas de vidro, e observaram que microrganismos Gram negativos predominaram nas águas

contidas em garrafas de PVC ao passo que os microrganismos Gram positivos predominaram nas garrafas de vidro. SONCINI *et al* (16) compararam as contagens de microrganismos aeróbios, anaeróbios e microaerófilos em amostras de água mineral embalada em PVC e em vidro, e também constataram predomínio de microrganismos Gram negativos nas águas em garrafas de PVC sendo que os Gram positivos constituíram a maior proporção da microbiota da água contida em garrafas de vidro. O PVC pareceu também influenciar as contagens de microrganismos aeróbios, anaeróbios e microaerófilos que foram sempre mais elevadas nas águas contidas neste tipo de material. YURDUZEV & DUCLUZEAU (17) investigando a multiplicação da microbiota total de *Pseudomonas* da água mineral "Vittel" engarrafada em plástico e em vidro, observaram que as contagens aumentaram durante as 2 ou 3 primeiras semanas, para depois permanecerem constantes até o fim do período do estudo. As contagens na água engarrafada em material plástico foram ligeiramente superiores às obtidas em águas embaladas em vidro. A multiplicação e sobrevivência de *P. aeruginosa* em água mineral não carbonatada esterilizada por filtração e por autoclavagem e sem nenhum tratamento foi comparada por GONZALES *et al* (9) em diferentes temperaturas de armazenamento. Foi demonstrado que *P. aeruginosa* se multiplica bem em temperaturas de 20-30 °C e 37 °C, podendo atingir populações de até 10⁴ UFC/ml em presença de outras bactérias que constituem a microbiota natural da água mineral, seguida de uma lenta diminuição com o decorrer do tempo. DUQUINO & ROSENBERG (5) isolaram, a partir de água mineral, cepas de *Pseudomonas* que são freqüentemente encontradas em pacientes que apresentam infecções secundárias e observaram diferentes graus de resistência aos antibióticos.

Em geral existe pouca informação sobre a microbiologia de águas minerais não-carbonatadas, engarrafadas, recebendo sempre a maior atenção a composição química das mesmas. Escassa também, é a informação existente sobre os aspectos microbiológicos das águas minerais engarrafadas, já que teoricamente esta pode abrigar microrganismos capazes de se desenvolverem no período médio entre a embalagem e o consumo. Especial atenção merece a *P. aeruginosa* pelo fato de estar freqüentemente presente em águas minerais não carbonatadas e ser uma bactéria patogênica oportunista (3) capaz de provocar doença no homem, especialmente em crianças e indivíduos imunodeprimidos. Na Europa a constatação da presença de *P. aeruginosa* em águas minerais já foi motivo para a retirada de lotes contaminados dos locais de venda (11, 14).

Este trabalho teve por objetivo estudar a evolução da microbiota heterotrófica naturalmente presente na água mineral, não-carbonatada, engarrafada em 3 tipos de materiais e a evolução da população de *P. aeruginosa* em particular, durante o armazenamento em temperatura de 30°C ± 1°C por um período de 6 meses.

2 — MATERIAIS E MÉTODOS

Garrafas de PVC, polipropileno e vidro destinadas à embalagem de água mineral, foram lavadas com água e detergente doméstico e enxaguadas sete vezes com água corrente e uma vez com água destilada estéril. A seguir as

garrafas de vidro foram cobertas com um selo de papel alumínio, colocado levemente frouxo e, a seguir, secas em estufa de secagem e esterilização a 105°C durante 4 horas. As garrafas de PVC e polipropileno foram colocadas em local ao abrigo de poeira, sobre um pano estéril em posição que permitisse a drenagem da água e cobertas também com pano estéril. As tampas foram lavadas com água e detergente, enxaguadas e secas com pano estéril. Uma vez secas, as garrafas tampadas e bem protegidas em sacos plásticos foram colocadas dentro de caixas de papelão e transportadas até uma firma no município de Lindóia, onde foram enchidas com água mineral. Antes do enchimento, as garrafas foram enxaguadas duas vezes com a água mineral em questão. De volta ao laboratório as garrafas foram colocadas em incubadora a 30°C ± 1°C e mantidas nessas condições durante o tempo do estudo.

Os microrganismos heterotróficos totais foram enumerados por inoculação em duplicata em placa, utilizando-se o meio de ágar-padrão para contagem (PCA), seguido de incubação a 35°C durante 7 dias (1). A enumeração foi realizada em 3 amostras de água mineral para cada tipo de embalagem em estudo, no dia do engarrafamento da água, a seguir quinzenalmente no início do estudo e mensalmente, na fase final.

A evolução da contaminação por *P. aeruginosa* foi estudada inoculando garrafas de água mineral (preparadas como já descrito) com uma suspensão de *P. aeruginosa* ATCC 10145. A cultura em crescimento ativo foi suspensa em solução fisiológica e a população avaliada por inoculação em superfície de placas com meio de Ágar *Pseudomonas* P, seguido de incubação a 35°C durante 48h (4). O inóculo foi adicionado à água mineral, de modo a obter uma contaminação da ordem de 10² UFC/ml. Este nível de inóculo foi escolhido porque nossa experiência anterior em exames de amostras de água revelou que o Número Mais Provável (NMP) mais elevado, encontrado, de *P. aeruginosa* tem se situado, por volta de 16/100 ml. Portanto, foi inoculada uma população superior à que normalmente ocorre, porém, não excessivamente elevada, de maneira a não ocasionar maiores alterações no que diz respeito ao equilíbrio com a microbiota natural.

A evolução da população de *P. aeruginosa* foi avaliada semanalmente no início da experiência e quinzenalmente no fim do estudo, utilizando 3 amostras por vez de cada tipo de embalagem contendo água mineral. Cabe destacar que as amostras de água foram sempre retiradas das mesmas garrafas durante toda a experiência. Antes da retirada das amostras, foi colocado em cada garrafa, um agitador magnético de barra esterilizado e realizada agitação sobre placa magnética durante 5 minutos. A população de *P. aeruginosa* foi determinada segundo a metodologia recomendada pela AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (1), com inoculação em caldo asparagina e confirmação em ágar acetamida.

3 — RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas Figuras 1 e 2 pode ser observada a variação da contaminação total por microrganismos heterotróficos totais nos meios de Ágar-Padrão para Contagem (PCA) e Ágar R2A, para a água mineral contida em garrafas de vidro e de

polipropileno, respectivamente. A população inicial foi em ambos os casos superior a 10^3 UFC/ml. Em ambos os casos também foi constatado aumento da população nos primeiros 30 dias de armazenamento a 30°C e nos dois meios de cultura utilizados, para depois diminuir de maneira irregular e se manter aproximadamente constante até completar 6 meses de observação. A população máxima alcançada foi observada após 30 dias de estocagem quando foram observados valores próximos a 10^6 UFC/ml na água contida em embalagens de vidro e de polipropileno.

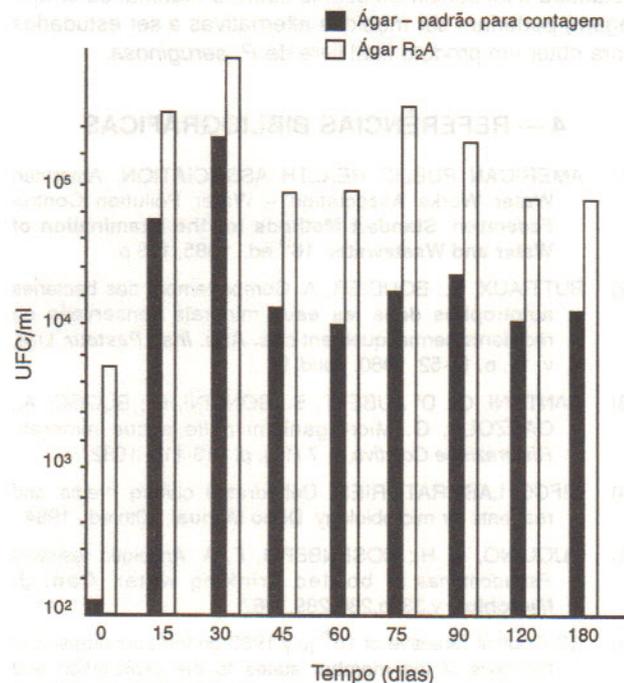


FIGURA 1. Heterotróficos totais em água mineral engarrafada em vidro durante seis meses de armazenamento a $30^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$.

Na Figura 3 está registrada a evolução da contaminação para água mineral contida em garrafas de PVC. Nos primeiros 15 dias de armazenamento, foi constatado um aumento da população de heterotróficos que atingiu valor superior a 10^5 UFC/ml, diminuindo irregularmente a seguir, para atingir ao cabo de 120 dias valores próximos ao da população inicial e que se mantiveram aproximadamente constantes até completar 180 dias. No meio de Ágar R₂A foram sempre obtidas contagens ligeiramente superiores às obtidas em PCA, provavelmente por ser aquele um meio mais rico, que propicia maior recuperação dos microrganismos.

Os valores obtidos para a contaminação por microrganismos heterotróficos totais estão de acordo com os resultados das pesquisas de BUTTIAUX & BOUDIER (2), SCHWALLER & SCHMIDT-LORENZ (15) e MANAIA *et al* (11).

No que diz respeito à evolução da contaminação por *P. aeruginosa* observou-se, de acordo com a Figura 4, um aumento sensível da população durante as duas semanas iniciais de armazenamento a 30°C , para todas as amostras de água embaladas nos três tipos de materiais em estudo.

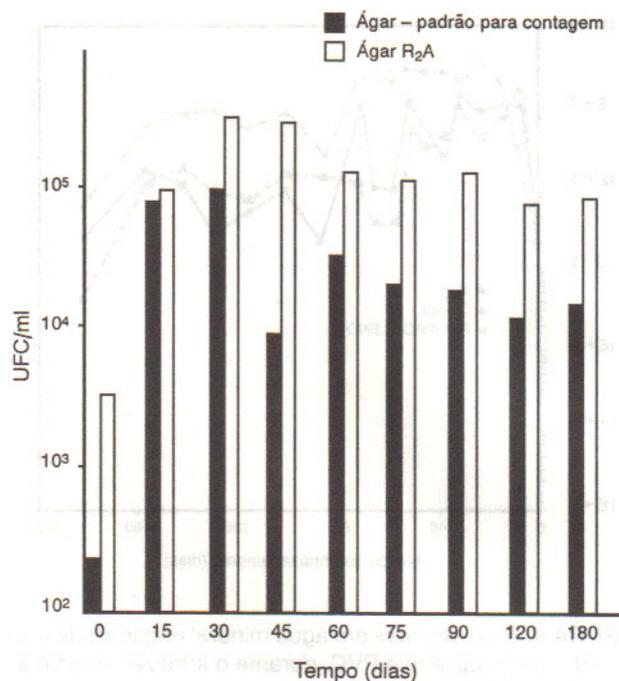


FIGURA 2. Heterotróficos totais em água mineral engarrafada em polipropileno durante seis meses de armazenamento a $30^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$.

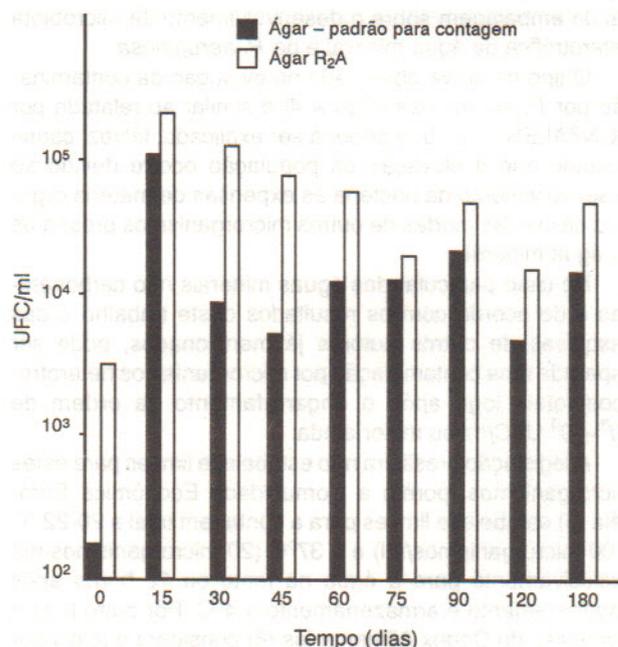


FIGURA 3. Heterotróficos totais em água mineral engarrafada em PVC durante seis meses de armazenamento a $30^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$.

Após 20 dias, foi constatada, para todos os tipos de materiais, uma tendência à diminuição da população de *P. aeruginosa*, chegando a atingir ao cabo de 180 dias, valores médios de $4,4 \times 10^2$ UFC/ml, $3,9 \times 10^1$ UFC/ml e $1,7 \times 10^2$ UFC/ml nas embalagens de vidro, PVC e polipropileno, respectivamente, que foram muito próximos ao valor da contaminação inicial.

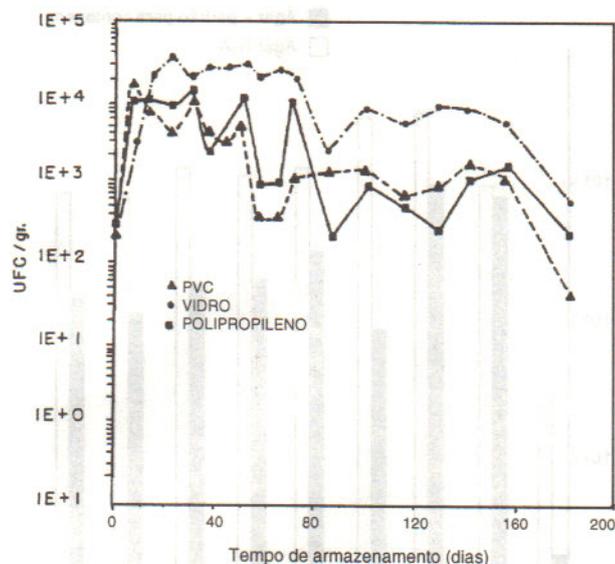


FIGURA 4. *P. aeruginosa* em água mineral engarrafada em vidro, polipropileno e PVC, durante o armazenamento a 30°C ± 1°C.

Não foram constatadas diferenças acentuadas entre os 3 tipos de embalagens estudadas, indicando que, nas condições do presente trabalho, não houve influência do material da embalagem sobre o desenvolvimento da microbiota heterotrófica da água mineral e de *P. aeruginosa*.

O tipo de curva observado na evolução da contaminação por *P. aeruginosa* (Figura 4) é similar ao relatado por GONZALES *et al.* (9) e poderia ser explicado, talvez, considerando que a elevação da população ocorre devido ao desenvolvimento da bactéria às expensas de matéria orgânica de células mortas de outros microrganismos presentes na água mineral.

No caso particular das águas minerais não carbonatadas e de acordo com os resultados deste trabalho e das pesquisas de outros autores já mencionados, pode ser esperada uma contaminação por microrganismos heterotróficos totais logo após o engarrafamento da ordem de 10³-10⁴ UFC/ml ou maior ainda.

A legislação brasileira não estabelece limites para estes microrganismos, porém a Comunidade Econômica Européia (6) estabelece limites para a contagem total a 20-22 °C (100 microrganismos/ml) e a 37°C (20 microrganismos/ml) exclusivamente para a água na fonte ou 12 horas após engarrafamento e armazenamento a 4°C. Por outro lado a Comissão do Codex Alimentarius (8) considera que o valor máximo para a contagem total por ml da água na fonte ou em pontos críticos de controle a 20-22°C e a 37°C depende das características da fonte ou da determinada pela autoridade local.

No que diz respeito à contagem de *P. aeruginosa* a Comunidade Econômica Européia e a Comissão do Codex Alimentarius estabelecem ausência em 250 ml ao passo que a legislação brasileira vigente nada específica. Cabe salientar que já existem sugestões de revisão e atualização da norma brasileira recomendando ausência de *P. aeruginosa* em 100 ml e um limite máximo para microrganismos heterotróficos totais de 10³ UFC/ml, mas até o momento nada

tem sido concretizado continuando em vigor a Resolução 25/76 da CNNPA (12). Cabe neste momento salientar que EIROA *et al.* (7) evidenciaram a ocorrência de *P. aeruginosa* em diferentes fontes de água mineral, dependendo da época de amostragem. Portanto a ocorrência natural da bactéria pode ser inevitável, sendo necessárias medidas adicionais de controle para garantir a ausência de *P. aeruginosa* no produto final. A carbonatação, o uso de filtros de carvão ativado (desde que adequadamente mantidos), a pasteurização ou a ozonização (desde que devidamente estudada a influência do ozônio sobre o material de embalagem) poderiam ser medidas alternativas a ser estudadas para obter um produto final livre de *P. aeruginosa*.

4 — REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. American Water Works Association - Water Pollution Control Federation. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 16th ed., 1985, 126 p.
- (2) BUTTIAUX, R.; BOUDIER, A. Comportement des bactéries autotrophes dans les eaux minérales conservées en récipients hermétiquement clos. *Ann. Inst. Pasteur*, Lille, v. 11, p. 13-52, 1960. apud. 9.
- (3) CANTONI, C.; D' AUBETT, S.; SONCINI, G.; BUOGO, A.; CAZZOLA, G. Microrganismi nelle acque minerali. *Ristorazione Coletiva*, v. 7 (11), p. 113-116, 1982.
- (4) DIFCO LABORATORIES. Dehydrated culture media and reagents for microbiology. *Difco Manual*, 10th ed., 1984.
- (5) DUQUINO, H. H.; ROSENBERG, F. A. Antibiotic resistant *Pseudomonas* in bottled drinking water. *Can. J. Microbiol.*, v.33, p.286-289,1987.
- (6) EC-Council Directive of 15th July 1980 on the approximation of the laws of the member states to the exploitation and marketing of natural mineral water (80/777/EEC). *Offic. J. Europ. Communities*, 30.3. 1980, N°L 229/1.
- (7) EIROA, M.N.U.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. Avaliação microbiológica de linhas de captação e engarrafamento de água mineral. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 16 (2): 91-178, jul-set. 1996.
- (8) FAO/WHO Codex Alimentarius Commission (1985). Report of the twentieth session of the Codex committee on food hygiene. Washington D.C. 1-5 October 1984. *Alinorm* 85/13A.
- (9) GONZALES, C.; RAMIREZ, C.; PEREDA, N. Multiplication and survival of *Pseudomonas aeruginosa* in uncarbonated natural mineral water. *Microbiologie Aliments - Nutrition*, v. 5 (2), p. 111-115, 1987.
- (10) INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). **Natural Mineral Waters**. Vol. II, cap. 28, p. 834-837, 1980,997p.
- (11) MANAIA, C.M.; NUNES, O. C.; MORAIS, P.V.; DA COSTA, M.S. Heterotrophic plate counts and the isolation of bacteria from mineral waters on selective and enrichment media. *Journal of Applied Bacteriology*, 69,871-876, 1990.
- (12) MINISTÉRIO DA SAÚDE. Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. Resolução 25/76. Portaria nº 14/BSB de 12-01-77. **D.O. Seção I, Parte I. 03-02-77**.
- (13) MORAIS, P.V.; DA COSTA, M.S. Alterations in the major heterotrophic bacterial populations isolated from a still bottled mineral water. *Journal of Applied Bacteriology*, 69, 750-757, 1990.

