



**Fundação Educacional do Município de Assis
Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis
Campus "José Santilli Sobrinho"**

ELIANE APARECIDA SIMEÃO

**ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE ÁGUA MINERAL CONSUMIDA NA
FUNDAÇÃO EDUCACIONAL DO MUNICÍPIO DE ASSIS**

Assis - SP
2011

Av. Getúlio Vargas, 1200 – Vila Nova Santana – Assis – SP – 19807-634
Fone/Fax: (018) 3302 1055 - E-mail: www.fema.edu.br

ELIANE APARECIDA SIMEÃO

ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE ÁGUA MINERAL CONSUMIDA NA
FUNDAÇÃO EDUCACIONAL DO MUNICÍPIO DE ASSIS

Trabalho de conclusão de curso de graduação em Química Industrial do Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis, como exigência para obtenção do título de Química Industrial.

Orientador: Elaine Amorim Soares Menegon
Área de Concentração: Química Industrial

Assis
2011

FICHA CATALOGRÁFICA

Simeão, Eliane Aparecida

Análise microbiológica de água mineral Consumida na Fundação Educacional do Município de Assis / Eliane Aparecida Simeão. Fundação Educacional do Município de Assis - FEMA -- Assis, 2011.

60p.

Orientador: Elaine Amorim Soares Menegon.

Trabalho de Conclusão de Curso – Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis – IMESA.

1.Água Mineral. 2.Qualidade. 3.Microbiológica

CDD:660

Biblioteca da FEMA

ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE ÁGUA MINERAL CONSUMIDA NA FUNDAÇÃO
EDUCACIONAL DO MUNICÍPIO DE ASSIS

ELIANE APARECIDA SIMEÃO

Trabalho de Conclusão de curso
apresentado ao Instituto Municipal
de Ensino Superior de Assis, como
requisito do curso de Química
Industrial, analisado pela seguinte
comissão examinadora:

Orientador: Elaine Amorim Soares Menegon

Analisador: Marta Elenita Donadel

Assis
2011

Dedico este trabalho primeiramente á Deus que esta sempre comigo em todos os momento de minha vida, a minha super mãe Noemia, que sempre esta meu lado com muito amor e admiração.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente á Deus e a Nossa Senhora por estarem sempre ao meu lado e por me atenderem.

Agradeço a minha super mãe que uma benção na minha vida, é anjo que Deus pós a terra para ficar ao meu lado, não tenho nem palavras para agradecer o quanto tem feito por mim. Amor da minha vida.

Ao minha família a qual sempre posso contar, estão comigo nos momentos alegres e tristes, me confortando em seu braços.

A minha tia madrinha Nelci que é uma maezona, a pessoa a qual tenho verdadeiro orgulho e admiração.

Ao meu irmão Damião e ao meu primo Casu que sempre me apoiou, a eles todo meu respeito e admiração paixão da minha vida

Ao meu pai Davi minha paixão incondicional e eterna.

Ao meu namorado Ricardo que sempre, sempre esteve ao meu lado não me desamparando quando estive para fraquejar, agradeço pelos dez anos de vivência, por toda alegria e realizações a pessoa que me ensinou muito, a pessoa a qual tenho muito orgulho e admiração de todo coração.

A todos os amigos e companheiros, Suze, Emília, Edson, Junior, Guilherme, em especial, a um grande amigo companheiro Edmilson uma pessoa admiravel.

A todos os prof^o que dedicaram um momento de suas vidas, para passar seus conhecimentos.

A minha orientadora Prof^a Elaine Amorim Soares Menegon, que me orientou e me cedeu o espaço para que eu realizasse todos os meus experimentos.

Aos funcionários e estagiarios companheiros do CEPECI, Fabiano, Indio, Emília, Gabi, Lucas, Rodolfo, Tati, Gustavo, Fernando, e aos novos estagiarios Daniel,

Joelma e a todos os outros que batalham muito neste lugar, com todo carinho e respeito ao Alecho e a Elaine .

A uma pessoa muito, mais muito especial que para sempre estará em mim, ao meu avó Eloi Elias Machado que apesar de não estar mais presente entre nós , sempre, sempre estará comigo eternamente no meu coração. Amor de toda a minha vida!

A todos muito Obrigada!

“O senhor fica perto dos que estão desamparados e salva os que perderam a esperança”.

Salmo
(34:18)

RESUMO

As águas minerais são aquelas que por sua composição química ou características físico – químicas são consideradas benéficas à saúde. São águas subterrâneas originárias das águas de superfícies, percolam pelas rochas absorvendo sais e outros minerais. O objetivo deste trabalho, foi de verificar a qualidade da água mineral consumida na Fundação Educacional do Município de Assis. Foram coletadas 32 amostras em 4 pontos de coleta durante 4 meses, com objetivo de realizar NMP de bactérias Coliformes fecais ou termotolerantes, Coliformes totais, *Enterococcus*, *Pseudomonas aeruginosa* e Contagem padrão ou Contagem de aeróbios mesófilos pelo método NMP/g. Através dos resultados obtidos das 32 amostras analisadas, 90% estavam de acordo com o padrão fixado pela Resolução nº 278, 22 de setembro de 2005 – ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária – dentro do limite máximo: Ausência de Coliformes totais ou termotolerantes/100 mL e de *Enterococcus* e Bactérias mesófilas, ou seja, com condições satisfatórias para o consumo humano. De acordo com a Resolução nº 275, 22 de setembro de 2005 – ANVISA – dentro dos limites máximos: Os resultados para *Pseudomonas aeruginosa* apresentaram condições não satisfatória, imprópria para consumo humano.

Palavra-chave: Água Mineral, Qualidade, Microbiológica.

ABSTRACT

Mineral waters are those who by their chemical composition or physico-chemical properties are considered beneficial to health. Are groundwater from surface water, liquid percolating through the rocks absorbing minerals salts, the goal of this work was to verify the quality of bottled water consumed in the educational foundation of the city of Assis, 32 samples were collected in four collection points during 4 monthsto perform NMP faecal coliforms bacteria or termotolerantes, coliform, *Enterococci*, *Pseudomonas aeruginosa* and counting pattern or mesophilic aerobic count by NMP/g. Through the results of the 32 samples tested, 90% were in accordance with the standard set by resolution No. 278, September 22, 2005 – ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária – within the ceiling: absence of coliform or termotolerantes/100 mL and Enterococcus and mesophilic Bacteria, i.e. with satisfactory conditions for human consumption. In accordance with resolution No. 275, September 22, 2005 – ANVISA – within the ceilings: results for *Pseudomonas aeruginosa* submitted unsatisfactory conditions, unfit for human consumption.

Keyword: Mineral water, Microbiological, Quality.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Aparelho para envase: (A) Maquin envasadora; (B) inspeção visual.....	22
Figura 2-	Transporte de água mineral (A) Caminhão pipa; (B) Caminhão com carregamento inadequado; (C) Caminhão coberto com lona adequadamente	23
Figura 3-	<i>Bactéria Echerichia Coli</i>	27
Figura 4-	(A) placa com bactérias aeróbicas; (B) um aparelho contador de colônias.....	28
Figura 5-	Coloração Gram positiva em forma de cocos	29
Figura 6-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	31
Figura 7-	Identificação presuntiva: Tubos de caldo acetamida e caldo de asparagina	32
Figura 8-	(A) Momento da coleta das amostras de água mineral de galão de 20 L; (B) Frascos de polietileno estéreis 500 mL identificados por numeração; (C) Caixa de isopor para armazenamento das amostras coletadas.....	38
Figura 9-	(A) Meios de cultura prontos; (B) Transferindo os meios prontos para os tubos	40
Figura 10-	Preparo das amostras para inoculação no fluxo laminar	42
Figura 11-	Local de armazenamento de galões de água impróprio	48
Figura 12-	(A) A Esterização da alça de platina no bico de bunsen; (B) Teste Confirmativo de Coliformes Totais e Fecais.....	49
Figura 13-	Resultados das amostras: Amostra (A) – Resultado EC negativo para Coliforme Fecal na Amostra (B) – Resultado VB negativo para Coliforme Totais na Amostra (C) – Resultado VB positivo para Coliforme Totais.....	49
Figura 14-	Resultados dos testes presuntivos: Amostra (A) – Teste presuntivo – positivo de <i>Enterococcus</i> ; Amostra (B) – Teste Confirmativo – negativo de <i>Enterococcus</i>	50
Figura 15-	Identificação dos meios: Caldo Asparagina (incolor) / Caldo acetamida (vermelho)	51

Figura 16- Resultados na luz ultravioleta: Amostra (A): Teste presuntivo negativo na luz ultravioleta de acetamida e asparagina; Amostra (B): Teste presuntivo positivo na luz ultravioleta de acetamida e Asparagina.....	51
Figura 17- Teste confirmativo: Figura (A) – Placa de Agar Leite estriada com amostra do teste presuntivo por tubos Múltiplos positivos; Figura (B) – Placa de Agar Leite estriada com amostra do teste presuntivo por tubos Múltiplos positivos; Figura (C) – Placa de Agar Leite teste confirmativo após 24 horas – Amostra positiva bem característica	52
Figura 18- (A) Estufa de 32°C; (B): Placas incubadas	53
Figura 19- Placas de Contagem padrão: Amostras (C e D) micro-organismos Mesófilos; (E) contagem de placas	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Amostra de indicativos limitantes.....	34
Tabela 2-	Mês e dias das coletas	37
Tabela 3-	Caldo Asparagina – 121°C/ minutos.....	41
Tabela 4-	Agar Leite – 121°C/15minutos.....	41
Tabela 5-	Data de Higienização.....	47
Tabela 6-	Resultados das Análises microbiológicos da Sala de Telefone.....	53
Tabela 7-	Resultados das Análises microbiológicos da Sala de Administração.....	54
Tabela 8-	Resultados das Análises microbiológicas da Sala dos Professores.....	54
Tabela 9-	Resultados das Análises microbiológicas do Laboratório CEPECI.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PCA	Ágar para Contagem Padrão
PSE	Ágar Pfizer Seletivo <i>Enterococcus</i>
CEPECI	Centro de Pesquisa em Ciência
EC	<i>Echerichia Coli</i>
VB	Verde Brilhante
CLS	Caldo Lauril Sulfate
NMP	Números Mais Provável
pH	Potencial hidrogeniônico
TSB	Bacto Typtic Soy Broth
UFC	Unidade Formadora de Colônias
ABINAM	Associação Brasileira de Industria de Água Mineral
DNPM	Departamento Nacional de Produção Mineral
ANVISA	Agência Nacional de Vogilância Sanitária
FEMA	Fundação Educacional do Município de Assis

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	17
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1	ÁGUA MINERAL	19
2.1.1	Captação e Envase	21
2.1.2	Transporte	23
2.2	MOCRO-ORGANISMOS CONTAMINANTES DA ÁGUA MINERAL	24
2.2.1	Coliformes Totais.....	24
2.2.2	Coliformes Fecais ou termotolerantes.....	25
2.2.3	<i>E.coli</i>	25
2.2.4	Micro-organismos mesófilos aeróbios	27
2.2.5	<i>Enterococcus</i>	28
2.2.6	<i>Pseudomonas</i>.....	30
2.3	LEGISLAÇÃO	33
3.	METODOLOGIA	35
3.1	Material	35
3.1.1	Amostragem.....	35
3.1.2	Higienização dos bebedouros e dos galões.....	35
3.2	MEIOS DE CULTURA	36
3.3	EQUIPAMENTOS	36
3.4	PROCEDIMENTO.....	37
3.4.1	Coleta.....	37
3.4.2	Preparo de meios de cultura.....	38
3.4.2.1	Preparo do meio de cultura para coliformes fecais e totais.....	39
3.4.2.2	Preparo do meio de cultura para <i>Enterococcus</i>	39
3.4.2.3	Preparo do meio de cultura para <i>Enterococcus</i> ágar base teste confirmativo (PSE).....	39
3.4.2.4	Preparo do meio de cultura para contagem padrão.....	39
3.4.2.5	Preparo do meio de cultura VB e EC para confirmação de coliformes fecais e totais	40

3.4.2.6	Preparo do meio de cultura Acetamida teste presuntivo de <i>Pseudomonas</i>	40
3.4.3	Detecção de patógenos na água mineral	42
3.4.3.1	FLUXOGRAMA DAS ANÁLISES.....	43
3.4.3.1.1	Coliformes totais e fecais – Técnica dos Tubos Múltiplos.....	43
3.4.3.1.2	Identificação de bactérias mesófilas – Técnica de placas invertidas (Pour Plate).....	44
3.4.3.1.3	<i>Enterococcus</i> – Técnica dos Tubos Múltiplos.....	45
3.4.3.1.4	<i>Pseudomonas</i> - Técnica dos Tubos Múltiplos.....	46
4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	47
4.1	TESTES CONFIRMATIVOS	48
4.1.1	Analises de coliformes totais e fecais	48
4.1.2	Análise realizada para <i>Enterococcus</i>	50
4.1.3	Análise realizada para <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	50
4.1.4	Análise para contagem padrão	52
4.2	TABELAS – RESULTADOS DA ÁGUA MINERAL	53
5.	CONCLUSÃO	57
	REFERÊNCIAS:	58

1. INTRODUÇÃO

As águas minerais são águas subterrâneas originárias das águas de superfícies que se infiltram no solo, atingindo grandes profundidades, essa profundidade fornece condições físico-químicas especiais à água, onde há maior temperatura e pH alcalino (WIKIPEDIA, ÁGUA MINERAL, 2010).

Algumas águas minerais podem ser originárias de regiões com algumas atividades vulcânicas (WIKIPEDIA, ÁGUA MINERAL, 2010).

Existem diversos tipos de água mineral, sendo classificadas segundo as suas composições químicas, origem da fonte, temperatura e gases presentes. Esses aspectos determinam seu uso: Como para bebida, para banhos e terapias (WIKIPEDIA, ÁGUA MINERAL, 2010).

O comércio de água mineral engarrafada teve aumento significativo no Brasil. No Rio de Janeiro e em Porto Alegre o consumo dobrou nos últimos três meses até janeiro 2010. Na região Nordeste, as vendas cresceram 30% no mesmo período. No Sudeste, o aumento foi de 25%, no Norte 10% (FURBINO,2010).

O crescimento tem ficado, em média, entre 8% e 10% ao ano podendo atingir até 20% no verão – é uma realidade nas empresas nacionais e multinacionais, que também já desembarcaram no país com suas marcas de águas: Coca Cola(Crystal), Nestlé (Santa Bárbara) e Danone (Bonafont) (FURBINO, 2010).

Nesse ritmo, a perspectiva de análise é de que o consumo chegue próximo a 11 bilhões de litros no País e a 229 bilhões de litros no mundo, em 2010 (PADILLA, 2007).

Os maiores produtores e consumidores de água mineral são os Estados Unidos, com 29,6 bilhões por ano e 80 litros per capita, seguida da China, com produção e consumo equivalente a 16,7 bilhões e consumo per capita de 18 litros/ano (PADILLA, 2007).

O assunto água é questionado freqüentemente hoje pela mídia e a sociedade como

o governo, por ser um bem tão valioso com riscos de escassez. As águas doces vêm sofrendo um grande processo de degradação ambiental, muitas vezes por falta de saneamento básico, lançamento de influentes industriais sem o devido tratamento adequado, o grande desmatamento de matas ciliares, a deposição inadequada de lixos e principalmente a falta de bom senso da própria sociedade que esbanja água sem pensar no amanhã. Instituições vêm elaborando projetos de conscientização para esse mal que se aproxima, trabalhos estão sendo realizados com crianças já que elas são o futuro (DIAS, 2001).

O governo, por meio da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), estabelece em Resolução – nº 275, DOU de 22/09/2005, para águas minerais e naturais, regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de água mineral natural e água natural. Apesar de existir em leis, e estas serem rigorosas, falta, no entanto, o seu cumprimento (ABINAM, 2010).

Este trabalho tem por objetivo coletar e analisar amostras de galões de 20 litros de água mineral comprada pela Fundação Educacional do Município de Assis para consumo de determinados departamentos, visando avaliar a qualidade microbiológica da água. Observou-se o período de higienização dos bebedouros da Instituição.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ÁGUAS MINERAIS

A água é um bem vital para a existência da vida. A água ocupa 70% da superfície da terra, a maior parte, estima-se que 97,50% da disponibilidade mundial da água estão nos oceanos (água salgada) e 2,493% encontram-se em regiões polares ou subterrâneas (aqüíferos), de difícil aproveitamento, Somente 0,007% as água doce disponível é própria para consumo humano e encontra-se em rios, lagos e pântanos (PICCININI, 2008).

Águas minerais são aquelas que por sua composição química ou características físico-químicas são consideradas benéficas à saúde, Toda água natural, por mais “pura” que seja, contém uma certa quantidade de sais. As águas subterrâneas são especialmente enriquecidas com sais retirados da própria rocha e sedimentos por onde percolam muito vagarosamente (WIKIPEDIA, ÁGUA MINERAL, 2010).

Quando a água surge através do subsolo e chega até a superfície, ela já passou por todo um processo de transformação ocorrido pela própria natureza. A água mineral é fabricada no momento em que as águas das chuvas penetram no solo e atravessam diversas camadas até chegar às camadas impermeáveis, onde estacionam (AMBIENTE BRASIL, 2010).

No trajeto por baixo do solo, a água passa por várias rochas que contém substâncias minerais como, Carbonato (CO_3) e o Sulfato de Cálcio (CaSO_4) que se diluem na água enriquecendo-a e fazendo com que adquira propriedades medicinais valiosas. Quando ocorre um grande acúmulo de água no subterrâneo ela sofre uma pressão, subindo para a superfície surgindo nascentes (AMBIENTE BRASIL, 2010).

Durante muito tempo acreditava-se que as águas minerais eram de uma origem diferente da água subterrânea. Sabe-se hoje que ambas tem a mesma origem: São água de superfície que infiltram no solo, atingindo profundidades maiores e que, por isto, se enriquecem em sais, adquirindo novas características físico-químicas, como

pH mais alcalino e temperatura maior (AMBIENTE BRASIL, 2010).

O consumo de água mineral avançou 15% e pode chegar a 20% de alta durante o verão, segundo previsão da Associação Brasileira de Indústria de Água Mineral (ABINAM). Os meses mais quentes – dezembro, janeiro e fevereiro – respondem, tradicionalmente, por 40% do consumo anual de água mineral (FURBINO, 2010).

Os maiores produtores de água mineral ou potável de mesa, em volume, no entanto, são, respectivamente: São Paulo (1,1 bilhão), Minas Gerais (225 milhões), Pernambuco (249 milhões), Rio de Janeiro (177 milhões), Paraná (159 milhões), Bahia (123 milhões) e Rio Grande do Sul (117 milhões) (FURBINO, 2010).

Segundo estatísticas do Departamento Nacional de Produção Mineral (DNPM) e Associação brasileira da Indústria de Água Mineral (ABINAM), o mercado mundial de água envasada vem apresentando constante expansão, a destacar-se frente a outras categorias de bebidas. A produção brasileira tem apresentado também esta tendência de expansão. Nos últimos anos, verificou-se um crescimento na ordem de 20% ao ano, dentre o Brasil situa-se como o sexto maior produtor. Entretanto, o consumo anual brasileiro ainda é muito baixo quando comparado com outros países (CORREIA *et al.*, 2010).

O setor registrou crescimento acumulado de 104%. Somente em 2001, segundo balanços do Departamento Nacional de Produção Mineral – DNPM e da Associação Brasileira da Indústria de Água Mineral – ABINAM, o volume de produção e consumo de água mineral engarrafada cresceu 23%, somando 4,32 bilhões de litros, comparado com o ano de 2008 a produção mundial de água mineral deve ter alcançado 206 milhões de litros (FURBINO, 2010).

A demanda mundial de água envasada vem mantendo um índice de crescimento da ordem de 20% ao ano. Os principais fatores que contribuíram para o crescimento do setor foram: A diminuição de formalidade, a melhora do nível de renda da população, a melhora na distribuição de produtos, as mudanças no estilo de vida dos consumidores na direção de produção naturais (FURBINO, 2010).

2.1.1 Captação e Envase

A captação consiste num conjunto de instalações e operações que são necessárias para exploração da água mineral ou de um aquífero, sem que ocorra alterações nas suas propriedades naturais e a pureza da água mineral ou potável de mesa. Ela surge através de fontes naturais ou poços artesianos. A água transfere-se para os reservatórios por meio de uma bomba, tomando todo cuidado para não haver contaminação da água por óleo e outras impurezas provenientes de seu funcionamento ou necessárias a sua manutenção (CORREIA *et al.*, 2010).

Todo processo de captação da água é feito dentro dos mais rigorosos padrões de exigência do DNPM – Departamento Nacional de Produção Mineral, com vantagens: a condição da fonte até as salas de engarrafamento é obtida por um processo natural, por gravidade, através de uma tubulação especial, não sendo necessário o uso de bombeamento (BLACK, 2002).

A limpeza e a higienização são extremamente fundamentais. As salas funcionam, as enchedoras são azulejadas até o teto e a limpeza é realizada nas instalações como no vestuário dos funcionários. A utilização de máquinas modernas e sofisticadas, para o enchimento das embalagens, garante a pureza e a qualidade das águas (BLACK, 2002).

O envase é um processo que pode ser aplicado em grande quantidade de materiais e servindo para conservação do mesmo, proteger, manipular, distribuir e preservar mercadorias em qualquer fase do seu processo produtivo, de distribuição a venda. Uma das principais funções do envase é de conservar o produto, e de proteger de contaminantes como bactérias e outros micro-organismos (ANVISA, Portaria nº 374).

Os produtos adquiridos pelo processo de envasamento podem ser de embalagens como copos, garrafas e galões. Estes são passados por um sistema de rinsagem, ou seja uma operação de higienização com água realizada nas embalagens antes de seu enchimento pode ser no vasilhame, enchedora, lacradora (tampadora), inspeção visual, rotuladora e empacotadora (caixa de papelão) (CETESB, 2005).

O processo de enchimento (Figura 1) deve preservar as características de qualidade do produto. A inspeção visual ou eletrônica – são de extrema importância para o processo, já que permitem o monitoramento do estado dos vasilhames ou dos produtos acabados, evitando que ocorra desvios no padrão de qualidade dos produtos (CORREIA *et al.*, 2010).



Figura 1 – Aparelho para envase: (A) Máquina envasadora; (B) inspeção visual do produto pronto.

A rotulagem é a identificação de cada vasilhame do produto, permitindo que seja rastreado da fábrica até o consumidor (CORREIA *et al.*, 2010).

Após passar pela inspeção final todo garrafão é lacrado, em seguida rotulado e finalmente estão prontos para serem transportados (CORREIA *et al.*, 2010).

2.1.2 – Transporte

De acordo com a Agência Nacional Vigilância Sanitária (ANVISA), através da Resolução RDC nº 06, 11 de dezembro de 2002 que dispõe sobre o regulamento técnico de transporte, distribuição e armazenamento e comércio de Água Mineral, Água Natural, Água Potável de Mesa e Purificada Adicionada de Sal, todos os responsáveis devem seguir procedimentos para garantir o padrão de qualidade da água engarrafada (CMBCONSULTORIA, 2007).

Os veículos (Figura 2) destinados ao transporte de água envasada (Mineral Natural, Potável de Mesa, Purificada Adicionada de Sais) devem se exclusivo para esse fim, ficando proibido o transporte de produtos químicos, inseticidas, raguicidas ou qualquer tipo de produto ou substâncias estranhas que possam comprometer ou contaminar a qualidade da água (CMBCONSULTORIA, 2007).

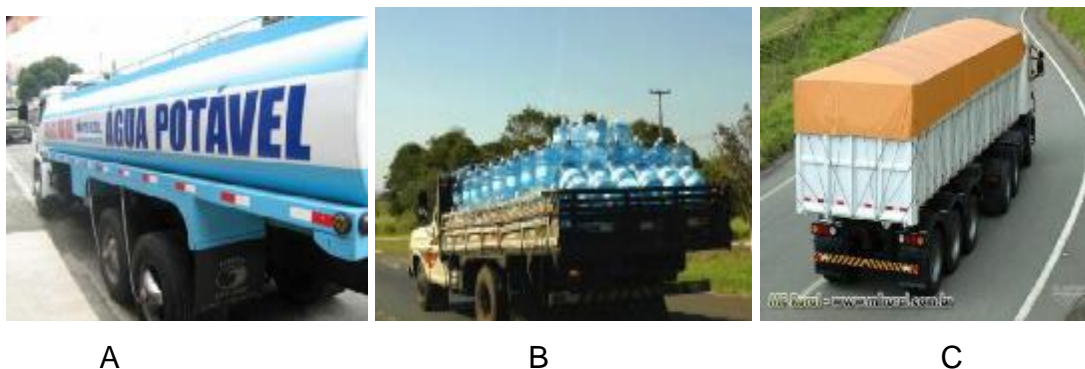


Figura 2 – Transporte de água mineral: (A) Caminhão pipa; (B) Caminhão com carregamento inadequado; (C) Caminhão coberto com lona adequadamente. (In: MF Rural)

Os métodos de higiene e limpeza devem ser adequados as características do produto, veículos de carroceria aberta devem possuir lonas e forrações impermeáveis isentas de furos e rasgos que permitam a passagem de água ou poeira, devendo estar limpas, secas e sem odores ou resíduos que possam correr o risco de contaminação. O veículo deve possuir Certificado de Vistoria Sanitária e esse Certificado deve ser renovado anualmente (CMBCONSULTORIA, 2007).

Segundo a Resolução da ANVISA RDC nº 173 de 13 setembro de 2006 e a Portaria nº 222 do DNPM os funcionários das empresas devem passar periodicamente por

cursos de capacitação, conscientização, visando à saúde pública (CMBCONSULTORIA, 2007).

2.2 MICRO-ORGANISMOS CONTAMINANTES DA ÁGUA MINERAL

2.2.1 – Coliformes Totais

O grupo Coliformes Totais inclui as bactérias na forma de bastonetes Gram negativos, não esporogênicos, aeróbios facultativos, capazes de fermentar a lactose com produção de gás, em 24 a 48 horas a 35°C. As bactérias Gram negativas possuem uma única membrana celular externa, dificultando assim o efeito dos fármacos e antibióticos, essa célula é rica em lipopolissacarídeo. Esses lipopolissacarídeos servem como um alarme isto é quando a bactéria Gram negativa entra na corrente sanguínea os lipopolissacarídeos avisa através de sintomas como febre alta e outros (SILVA, *et al.*, 2005).

O grupo inclui cerca de 20 espécies, dentre as quais se encontram tanto bactérias originárias do trato gastrointestinal de humanos e outros animais de sangue quente, como diversos gêneros e espécies de bactérias, como *Serratia* e *Aeromonas*. Por essa razão, sua enumeração em água e alimento é menos representativa, como indicação de contaminação fecal, do que a enumeração de coliforme fecal ou *E. coli* (SILVA, *et al.*, 2005).

A presença de grupo de bactéria Coliforme Total denota que ocorreu uma interferência externa na água mineral, já que esse grupo de bactéria não faz parte da composição química da água mineral. Podendo se dizer que a água não é pura, e essa contaminação pode ocorrer na fonte ou no envase devido à natureza do processo ou ao fato da reutilização de garrações não devidamente higienizado (SILVA, *et al.*, 2005).

2.2.2 – Coliformes Fecais ou Coliformes Termotolerantes.

O termo “termotolerantes” indica a tolerância a uma temperatura de até 44,5°C, são muitas vezes utilizados como indicadores da qualidade sanitária da água, mostra-se mais significativo que a bactéria Coliforme “Total”, devido às bactérias fecais estarem restritas ao trato intestinal de animais de sangue quente (WIKIPÉDIA, COLIFORMES FECAIS, 2010).

A determinação da concentração de coliformes fecais assume importância como parâmetro indicador de possibilidade da existência de micro-organismos patogênicos, responsáveis pela transmissão de doenças de veiculação hídrica. Restringindo-se aos membros capazes de fermentar a lactose com produção de gás, em 24 horas a 44,5 - 45,5°C. Esta definição objetivou, em princípio, selecionar a penas os coliformes originários do trato gastrointestinal. Atualmente sabe-se, entretanto, que o grupo dos coliformes fecais inclui pelo menos três gêneros: *Escherichia*, *Enterobacter* e *Klebsiella*, dos quais dois (*Enterobacter* e *Klebsiella*) se incluem em cepas de origem não fecal. Por esse motivo, a presença de coliformes fecais em água e alimentos é menos representativa, como indicação de contaminação fecal, do que a enumeração *E.coli*, porém muito mais significativa do que a presença de coliformes totais (SILVA, *et al.*, 2005).

2.2.3 – *Escherichia Coli*

A *Escherichia coli* (Figura 3) é uma bactéria Gram negativa mais comum e mais antiga, são aeróbias e/ou anaeróbias facultativas seu habitat natural é o lúmen intestinal, são diversas e apresenta forma de um bacilo e possui múltiplos flagelos em volta das células. Ela é lactase positiva, ou seja, possui uma enzima que cataliza a hidrólise da lactose e galactose, fermentadora de açúcares que é responsável pela flatulência (SILVA, *et al.*, 2005).

A *Escherichia coli* foi reconhecida pela primeira vez no Estados Unidos em 1982, quando houve uma ocorrência de surto de diarreia seguida de sangue, seu isolamento para sua descoberta foi feita em hambúrgueres contaminados (SILVA, *et al.*, 2005).

Muitas dessas bactérias produzem uma exotoxina, ou seja toxinas que são substâncias solúveis secretadas por bactérias vivas. essas podem também ser liberadas pelo citoplasma onde a organismos mortos tendo assim um efeito tóxico (ENVASE DE ÁGUA MINERAL, UNICAMP, 2010)

A síndrome-hemolítica-urêmica é uma infecção considerada severa provocada pela *Echerichia coli* Shiga Toxigênicas que frequentemente é seguida de cólicas estomacais severas, diarreias com sangue e vômitos. Á melhora em 5 a 7 dias quando a infecções é moderadas, em casos mais graves pode levar a morte pois a maioria desenvolve uma complicação fatal. A síndrome hemilitica-urêmica apresenta uma diminuição urinariam podendo ocasionar a parada dos rins, sintomas como sensação de cansaço, icterícia e hipertensão. Alguns casos necessitam de hemodiálise, outros apresentam problemas no sistema cardiovascular, sistema nervoso central seguido com infartos cardíaco (AROCHA, 1992).

As *Echirichia coli* Shiga Toxigênicas vivem no intestino de animais ruminantes, são transmitidas pelas fezes de humanos e animais devido à falta de higienização, o diagnosticadas são realizados por exames de fezes. Pessoas com resultados positivos SAP tratadas com glicocorticóides e muita hidratação, o uso de antibióticos não são recomendo (AROCHA, 1992).



Figura 3 - Bactéria de *Echerichia Coli*

A maioria das *E.coli* são inofensivas, mas outras podem causar inflamações intestinais, tais como febre tifóide, febre paratífóide, sintomas fortes diarreias, febre e vômitos, principalmente em crianças e idosos que apresenta o sistema imunológico frágil, podendo ocasionar desidratação que, em alguns casos, se torna fatal. Outro risco é de perfuração do intestino pela bactéria e cair na corrente sanguínea, levando a uma infecção generalizada (TRABULS, 2005).

2.2.4 . Micro-organismos Mesófilos Aeróbios

A contagem de micro-organismo mesófilos aeróbios é um método mais utilizado como indicador geral de populações bacterianas em alimentos. Não diferencia tipos de bactéria, sendo utilizado para se obter informações gerais sobre a qualidade de produtos, práticas de manufatura, matérias primas utilizadas, condições de processamento, manipulação e vida de prateleira ((SILVA, *et al.*, 2005).

Não é um indicador de segurança, pois não está diretamente relacionado à presença de patógenos ou toxinas. Dependendo da situação, pode ser útil na avaliação da qualidade, porque altas populações de bactérias podem indicar deficiências na sanitização ou falha no controle do processo ou dos ingredientes (SILVA, *et al.*, 2005).

Diluição em séries em placas, um método para se medir o crescimento bacteriano é a contagem padrão em placas (Figura 4). Esta técnica baseia-se no fato de que, em condições adequadas, à 32°C uma bactéria viva isolada se dividirá e formará uma colônia visível em uma placa de Agar. Uma placa de Agar é um meio nutritivo solidificado com Agar, um polissacarídeo complexo extraído de determinadas algas marinhas. Por ser mais difícil se encontrar mais do que 300 colônias em uma placa de Agar, é geralmente necessário diluir a cultura bacteriana original antes de se plaquear (transferir) um volume conhecido de cultura para placa sólida (TRABULS, 2005).



Figura 4 – (A) Placas com bactérias mesófilas anaeróbias; (B) um aparelho contador de colônias.

É preciso, tomar determinadas medidas para evitar interpretações errôneas, como período em que é colhida a amostra, transporte apropriado, tempo transcorrido entre a coleta e a análise, dentre outros (Black, Jacquelyn G, 2002). Neste método é conveniente preparar as amostras no mais curto intervalo de tempo para evitar a multiplicação dos micro-organismos (DIAS, 2008).

2.2.5. *Enterococcus*

São um gênero de bactérias do grupo D de Lancefield, que ocorre em grande quantidade nas fezes humanas e de outros animais, tendo o trato intestinal como habitat natural. São bactérias láticas e produzem ácidos láctico como principal produto do metabolismo fermentativo, se apresenta na forma de cocos ou cocos-bacilos em pares ou cadeias. Gram positivos (Figura 5) de (coloração roxa), imóveis, catalase negativos e anaeróbios facultativos, cujas principais características diferenciais são a capacidade de crescer a 10°C, pH 9,6 e na presença de NaCl (SILVA, *et al.*, 2005).

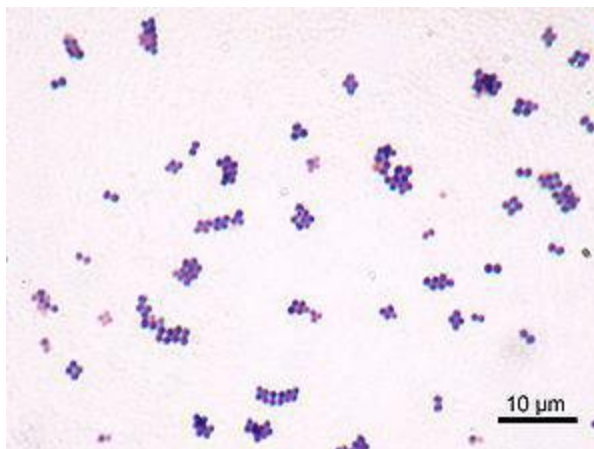


Figura 5 - Coloração de Gram positiva em forma de cocos

Podem persistir por longo tempo em águas de irrigação, com alto teor de eletrolítico, porém não se multiplicam nas águas poluídas, sendo sua presença uma indicação de contaminação fecal recente. Adicionalmente, a identificação da espécie pode dar uma indicação da origem da contaminação fecal (humana ou animal) (SILVA, *et al.*, 2005).

As principais aplicações da contagem são a avaliação e controle de qualidade de água mineral e água natural (tanto na origem quanto no processo e no produto envasado) (SILVA, *et al.*, 2005).

De modo geral, esses micro-organismos são nutricionalmente exigentes, mas crescem bem em ágar sangue e em caldo nutriente contendo glicose. São anaeróbios facultativos, alguns podem crescer melhor em atmosfera rica em CO₂ (5%) ou em anaerobiose. Os *Enterococcus* constituem um importante grupo de micro-organismos que se destacam, cada vez mais, como patógenos oportunistas (TRABULS, 2005).

Enterococcus faecalis espécie mais freqüentes do gênero, compreendendo cerca de 80 a 85% das amostras de *Enterococcus* isolados de material clínico. Ganhou grande proeminência nos últimos anos. Porque se tornou um dos agentes mais importantes de infecção hospitalar, com o agravante de ter adquirido resistência à maioria dos antibióticos, incluindo a vancomocina. Uma característica cultural interessante a sua capacidade de crescer em condições variadas de temperatura e de pH, bem como em presença de elevadas concentrações de cloreto de sódio

(NaCl) e de bile (TRABULS, 2005).

São membros da flora normal do trato intestinal, e são também encontrados nas mucosas de outros tratos, em menor concentração. As infecções surgem quando a bactéria é translocada para órgãos ou locais sensíveis como: Trato urinário, as feridas, sobretudo as decorrentes de cirurgia, e a corrente circulatório, as feridas, sobretudo as decorrentes de cirurgia, e a corrente circulatória são os locais mais infectados (BLACK, 1999).

O diagnóstico é feito pelo isolamento e pela identificação da amostra, o isolamento não oferece dificuldade, uma vez que os *Enterococcus* podem ser cultivados nos meios de cultura comuns, inclusive em meios seletivos para bactérias Gram negativas (TRABULS, 2005).

2.2.6. *Pseudomonas*

Pseudomonas (Figura 6) são bactérias aeróbias obrigatórias, que é mais comum surgirem em hospitais como infecções, necessitam de oxigênio livre para a respiração aeróbia. São geralmente bastonetes aeróbicos móveis com flagelos polares. Muitas espécies sintetizam um pigmento amarelo-esverdeado solúvel que se torna fluorescente sob luz ultravioleta. A maioria contém uma enzima oxidase que é um procedimento qualitativo, resultados positivos nos testes de oxidase nos organismos que contém citocromo C como parte da sua cadeia respiratória tornando o regente com coloração púrpura (TRABULS, 2005).

A *Pseudomonas aeruginosa* é o principal patógeno humano, é vista freqüentemente nas infecções do trato urinário e em ferimentos e queimaduras. São organismos muito resistentes e alguns podem mesmo crescer em soluções de limpeza siderúrgica, podendo causar infecções hospitalares (TRABULS, 2005).



Figura 6 – *Pseudomonas aeruginosa*

A *Pseudomonas* em água é reconhecida como patógenos oportunistas, responsáveis pelas septicemias fatais em crianças. A septicemia é uma infecção no sangue onde as bactérias se multiplicam rapidamente e há ocorrência também de toxinas, sendo descrito esse patógeno como sangue envenenado (BIANCARELLI, 2004).

As *Pseudomonas* podem desempenhar papéis importantes em surtos de gastroenterites veiculadas pela água) (SILVA, *et al.*, 2005).

Em águas de piscinas estudos têm demonstrado uma relação a incidência de otites em nadadores e sua presença em água recreacionais. A contaminação dessas águas pode ser de água fecal (originária do corpo dos banhistas), urina ou da própria fonte de água que abastece as piscinas (SILVA, *et al.*, 2005).

Elevados números de *Pseudomonas aeruginosa* em água potável, principalmente em água engarrafada, pode estar relacionado a mudança no paladar, odor e turbidez dessas águas) (SILVA, *et al.*, 2005).

Pseudomonas aeruginosa apresenta maior resistência que micro-organismos patogênicos, sendo capaz de inibir as bactérias do grupo coliforme (SILVA, *et al.*, 2005).

P. aeruginosa dificilmente poderia causar uma infecção em um indivíduo normal, o início da infecção requer uma alteração substancial das defesas das primeiras linhas do organismo. Tal alteração pode ser o resultado de uma interrupção das barreiras cutâneas ou mucosas (trauma, cirurgias, queimaduras, diálises, transplantes, e uso

prolongado de cateter), uma imunodepressão fisiológica (prematuros, neonatos e idosos), ou de uma imunodepressão clínica (diabetes, neoplasia, imunodeficiência) (TRABULS, 2005).

O diagnóstico é feito através do isolamento. A identificação é favorecida pela versatilidade do micro-organismo na utilização de nutrientes, o que permite um crescimento rápido em praticamente todos os meios seletivos. A identificação presuntiva é extremamente fácil quando a bactéria tem comportamento típico, isto é, produz piocianina ou pioverdinina que imprime cor verde-azulada ao meio de cultura e odor característico (TRABULS, LUIZ 2005).

A Figura 7 mostra tubos de caldo acetamida e caldo asparagina com presença de *Pseudomonas aeruginosa*, a coloração verde é decorrente do pigmento piocianina ou pioverdinina.

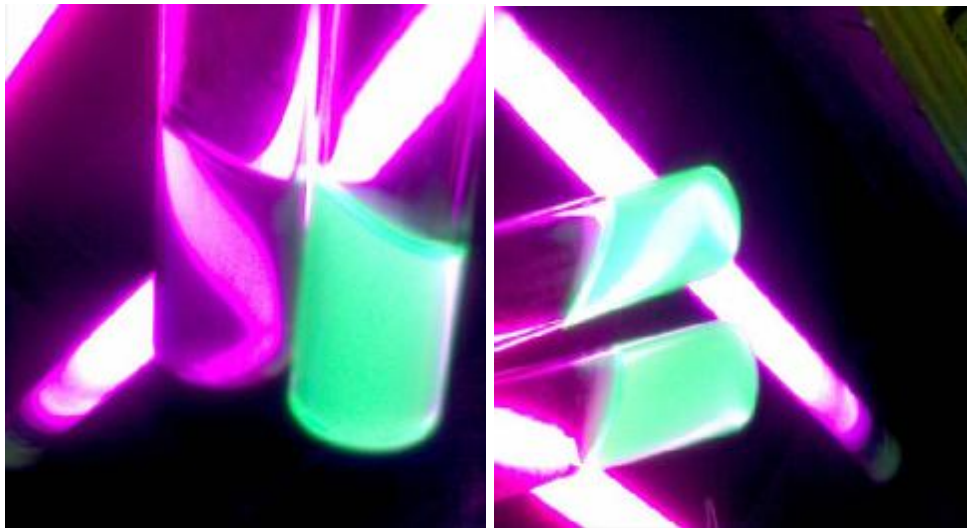


Figura 7 – Identificação presuntiva: Tubos de caldo acetamida e caldo de asparagina

A infecção é naturalmente resistente à maioria dos antibióticos usados no tratamento das infecções causadas por outras bactérias Gram positivas, além disso, pode adquirir resistência de maneira relativamente fácil aos antibióticos (TRABULS, 2005).

Essa bactéria é um problema na linha de envase de águas minerais. No primeiro contato de *Pseudomonas aeruginosa* com a linha de engarrafamento pode haver colonização dos tanques ou contaminação constante, para as águas que passem posteriormente por esses pontos que, se não forem removidos por um programa adequado de limpeza a sanitização do sistema de adução e engarrafamento, podem propiciar a presença de bactérias no produto final (DIAS, 2007).

2.3 LEGISLAÇÃO

A Água Mineral e a Água Natural envasada não devem apresentar riscos à saúde do consumidor (CERESB, Resolução da Diretoria Colegiada, 2005).

De acordo com a Resolução nº 275, de 22 de setembro de 2005- ANVISA- Agência Sanitária, que regulamenta os padrões microbiológicos para o exigido de Coliformes Totais e Fecais, *Pseudomonas* e *Enterococcus* em Água Mineral. A Tabela 1 mostra os padrões segundo a resolução acima.

Micro-organismo	Amostra indicativa limites	Amostra Representativa			
		n	c	m	M
<i>E. coli</i> ou coliforme (fecais) termotolerantes, em 100 mL	Ausência	5	0	-.-	Ausência
Coliformes totais, em 100 mL	<1,0 UFC; <1,1 NMP ou Ausência	5	1	<1,0 UFC; <1,1 NMP ou Ausência.	2,0 UFC ou 2,2 NMP
<i>Enterococos</i> , em 100 mL	<1,0 UFC; <1,1 NMP ou Ausência.	5	1	<1,0 UFC; <1,1 NMP ou Ausência.	2,0 UFC ou 2,2 NMP 2,0 UFC ou 2,2 NMP
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , em 100 mL	<1,0 UFC; <1,1 NMP ou Ausência	5	1	<1,0 UFC; <1,1 NMP ou Ausência	2,0 UFC ou 2,2 NMP 2,0 UFC ou 2,2 NMP

Tabela 1 – Características Microbiológicas para Água Mineral Natural e Água Natural.

n: É o número de unidades da amostra representativa a serem coletadas e analisadas individualmente.

c: É o número aceitável de unidades da amostra representativa que pode apresentar resultado entre os valores “m” e “M”.

m: É o limite inferior (mínimo) aceitável. É o valor que separa qualidade satisfatória de qualidade marginal do produto. Valores abaixo do limite “m” são desejáveis.

M: É o limite superior (máximo) aceitável. Valores acima de “M” não são aceitos. A mostras indicativa.

A amostra é condenada (rejeitada) quando for constatada a presença de *Escherichia coli* ou Coliformes (fecais) termotolerantes ou quando o número de coliformes totais e *Enterococcus* ou *Pseudomonas aeruginosa* for maior que o limite estabelecido para amostras indicativa.

3 – METODOLOGIA

3.1 - MATERIAL

3.1.1 – Amostragem

Foram coletadas 16 amostras de água mineral em, galão de 20l litros em 4 pontos da Instituição “FEMA” – Fundação Educacional do Municipal de Assis, no período de 4 meses.

Os pontos de coleta foram: Sala dos professores, Sala de telefonia, Sala da administração e no Laboratório CEPECI.

Foram observadas a higienização dos bebedouros e a data dos mesmos.

3.1.2 – Higienização dos Bebedouros e dos Galões

Os bebedouros da Instituição são higienizados pelos próprios funcionários, onde eles têm em mãos um manual de Limpeza e Conservação de Galões e Bebedouros. Os bebedouros são lavados com esponjas sem uso anterior com uma solução de bicarbonato de sódio. Após a lavagem é feito o enxágüe do reservatório e finalizando-se com outro enxágüe com água quente. A periodicidade da higienização é a cada quinze dias.

Os galões antes de serem colocados no bebedouro são lavados e enxaguados, logo após é passado uma flanela úmida com álcool 70%.

3.2 – MEIOS DE CULTURA

- Caldo Lauril Sulfate Broth _ Lote 102,3428 – Acumedia - CLCD
- Bacto TM Peptone-Enzymatia Digest of Protein – Lote 5055132 – BD H2O 1%
- Standard Methods Agar – Lote 101,875A-Acumedia - PCA
- Bacto TM Tryptic Soy Broth – Soy bean-casein Digest Medium – Lote 4342224 (BD) TSB
- Enterococcus – (Azide Dextrose Broth) – Lote wco14 (Himedia)
- Caldo EC Médium (Escherichia Coli at 44,5°C – Lote 0302-100-Acumedia - EC
- Caldo Brillam T Green Bile Broth 2%...Lote 101.558-Acumedia - VB
- Acetamide Broth (Twin Pack) – Lote 20661 (Himedia)-Acetamida
- M Enterococcus Àgar-Base for the Isolation and Enumeration of Enterococcus in Water and the Bacterias – Lote 0094001 (Difco)-PSE

3.3 - EQUIPAMENTOS

- Autoclave Vertical (Phoenix, modelo AV 75, nº 7302).
- Balança semi-análitica RADW 6.
- Balança analítica HR – 200
- Capela de Fluxo Laminar Vertical (TROX Technik, série 1341).
- Estufa de 25°C (Marconi, modelo MA 032/4, série 9719004).
- Estufa 32°C (Fanem, modelo 502/40, nº FT 1918).
- Estufa 35°C Fanem. (Modelo 502/40, nº FT 1917).
- Banho Maria 45°C Fanem. (Modelo

- Contador Phoenix TWM CP 660.
- Agitador Magnético TM – 005 Técnal.
- pHmetro Marconi MA – 522.

3.4 – PROCEDIMENTO

3.4.1 – Coleta

No procedimento seguido, as coletas foram realizadas referentes aos dias especificados na Tabela 2.

Mês	Dias
Março	08/22 de 2011
Abril	05/26 de 2011
Maio	10/24 de 2011
Junho	07/21 de 2011

Tabela 2 – Mês e dias das coletas

As águas amostradas foram coletadas utilizando-se frascos de polietileno estéreis de 500 mL com tampas à prova de vazamento. Antes da coleta, deixou-se a água fluir por alguns instantes, para eliminar possíveis resíduos da torneira. Foi verificou - se a data de higienização dos filtros a coleta, as amostras foram armazenadas dentro de uma caixa de isopor nova e bem higienizada com álcool 70% e com gelo para conservação das águas coletadas.

A caixa de isopor com as amostras foram armazenadas em câmara fria até o momento da análise.

As amostras de água foram inoculadas no mesmo dia da coleta, para que não houvesse nenhum risco de contaminação ou invalidação das amostras coletadas.

A Figura 8 mostra o momento de coleta seguido do procedimento de armazenagem descrito.

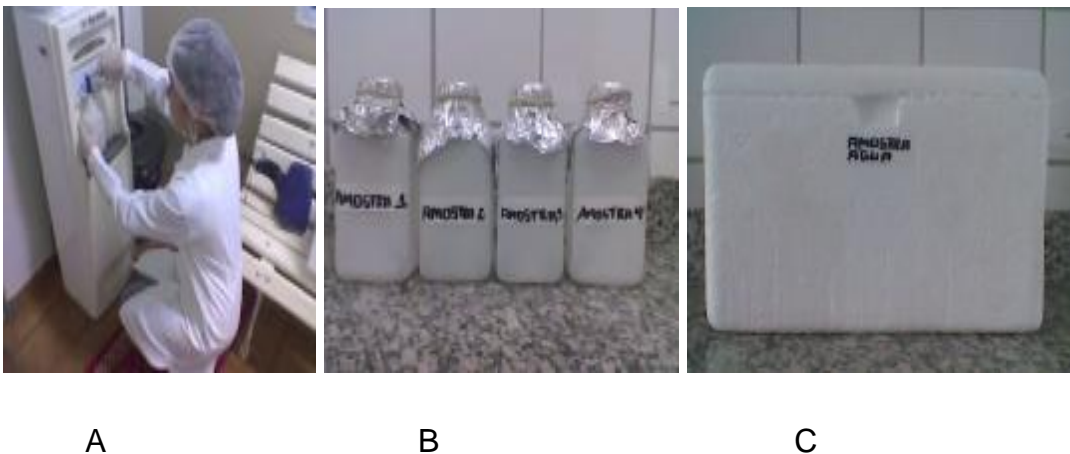


Figura 8 – (A) momento da coleta das amostras de água mineral de galão de 20 litro; (B) frascos de polietileno estéreis 500 mL identificados por numeração; (C) caixa de isopor para armazenamento das amostras coletadas.

3.4.2 – Preparo dos Meios de Cultura

Os meios de cultura prontos foram preparados de acordo com a instrução indicada em cada frasco do meio.

Todos os materiais e meios de cultura foram autoclavados em autoclave à 121 °C por 15 minutos e as vidrarias em estufas de 160 °C por 2 horas.

3.4.2.1 – Preparo do Meio de Cultura para Coliformes Fecais e Totais.

Em um béquer de 500 mL pesou-se 14,24, de Caldo Lauril Sulfato triptose e adicionou-se 200 mL de água destilada. A mistura foi mantida em agitação constante até a sua completa dissolução. Em seguida transferiu-se 10 mL do meio para os tubos de ensaio, colocou-se um tubo de Durhan invertido em cada tubo e autoclavou-se.

3.4.2.2 – Preparo do Meio de Cultura para *Enterococcus*.

Em um béquer de 500 ml pesou-se 6,94 g de Caldo Azide Dextrose e adicionou-se 200 ml de água destilada. Mantendo a mistura em constante agitação até sua completa dissolução. Em seguida transferiu-se 10 ml do meio para os tubos de ensaio e autoclavou-se.

3.4.2.3 - Preparo do Meio de Cultura para *Enterococcus* Agar Base Teste Confirmativo (PSE).

Em um erlenmeyer de 250 mL pesou-se 4,2 g de Enterococcus Agar Base e adicionou-se 100 ml de água destilada. Mantendo a mistura em constante agitação até sua completa dissolução. Transferiu-se 18 ml do meio para placas de petri.

3.4.2.4 – Preparo do Meio de Cultura para Contagem Padrão.

Em um erlenmeyer de 500 ml pesou-se 9,4 g de Standard Methods Agar e adicionou-se 400 ml de água destilada. Mantendo a mistura em constante agitação até sua completa dissolução. Transferiu-se 18 ml do meio para placas de petri.

3.4.2.5 - Preparo do Meio de Cultura VB e EC para Confirmação de Coliformes Fecais e Totais.

Em um béquer de 250 ml pesou-se 4,0 g de Caldo Brilliant Green Bile adicionou-se 100 mL de água destilada, a mistura foi mantida em agitação constante até a sua completa dissolução e foram transferido 5 mL para tubos de ensaio.

Em um béquer de 250 mL pesou-se 3,7 g de Caldo EC Medium e adicionou-se 100 ml de água destilada. A mistura foi mantida em agitação constante até a sua completa dissolução. Em seguida transferiu-se 5 ml do meio para os tubos de ensaio.

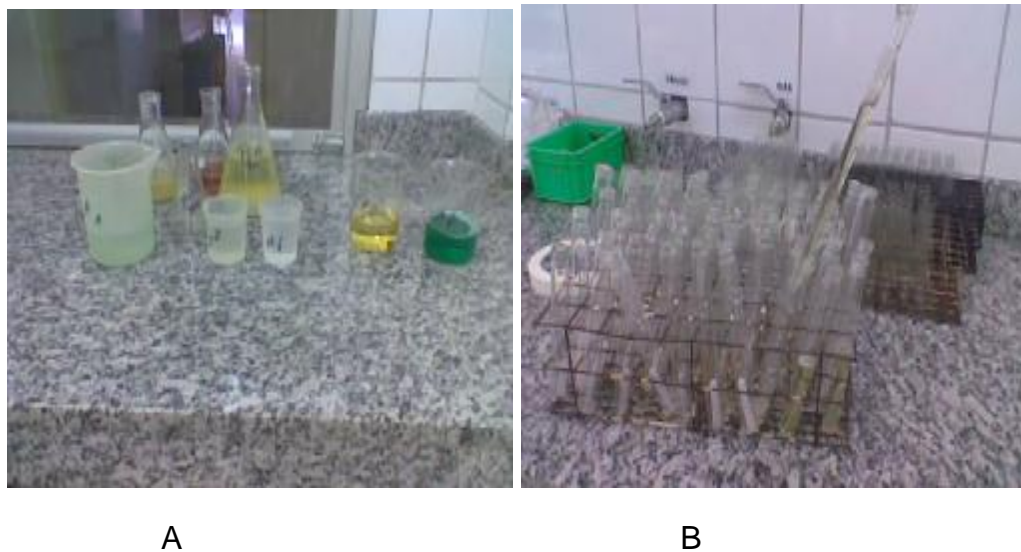


Figura 9 – (A) meios de cultura prontos; (B) transferindo-se os meios prontos para os tubos.

3.4.2.6 - Preparo do Meio de Cultura Acetamida Teste Presuntivo de *Pseudomonas*.

Em um béquer de 250 ml pesou-se 0,77 g de Caldo Acetamida e adicionou-se 100 mL de água destilada. A mistura foi mantida em agitação constante até a sua completa dissolução. Em seguida transferiu-se 5 mL do meio para os tubos de ensaio.

Os meios formulados foram preparados como se segue:

Caldo Asparagina - Meio para determinação de *Pseudomonas aeruginosa* pela técnica dos tubos múltiplos, teste presuntivo.

Agar Leite - Meio para determinação de *Pseudomonas aeruginosa*, teste confirmativo.

Composição

Asparagina	0,3g
Fosfato dipotássico (K ₂ HPO ₄)	0,1g
Sulfato de Magnésio (MgSO ₄ .7H ₂ O)	0,05g

Tabela 3 – Caldo asparagina – 121°C/15 minutos

Aplicação: meios para determinação de *Pseudomonas aeruginosa*, teste presuntivo.

Composição

Leite em pó desnatado instantâneo	20,0g
Agar Nutriente	20,0g

Tabela 4 – Agar Leite – 121°C/15 minutos

Aplicação: Meio para determinação de *Pseudomonas aeruginosa*, teste confirmativo.

3.4.3 – Detecção de Patógenos na água mineral

Empregou-se a metodologia de análise se acordo com o Manual de Métodos de Análises Microbiológica de Água, inoculando todas as amostras dentro do Fluxo Laminar (Figura 10) (SILVA, *et al.*, 2005).

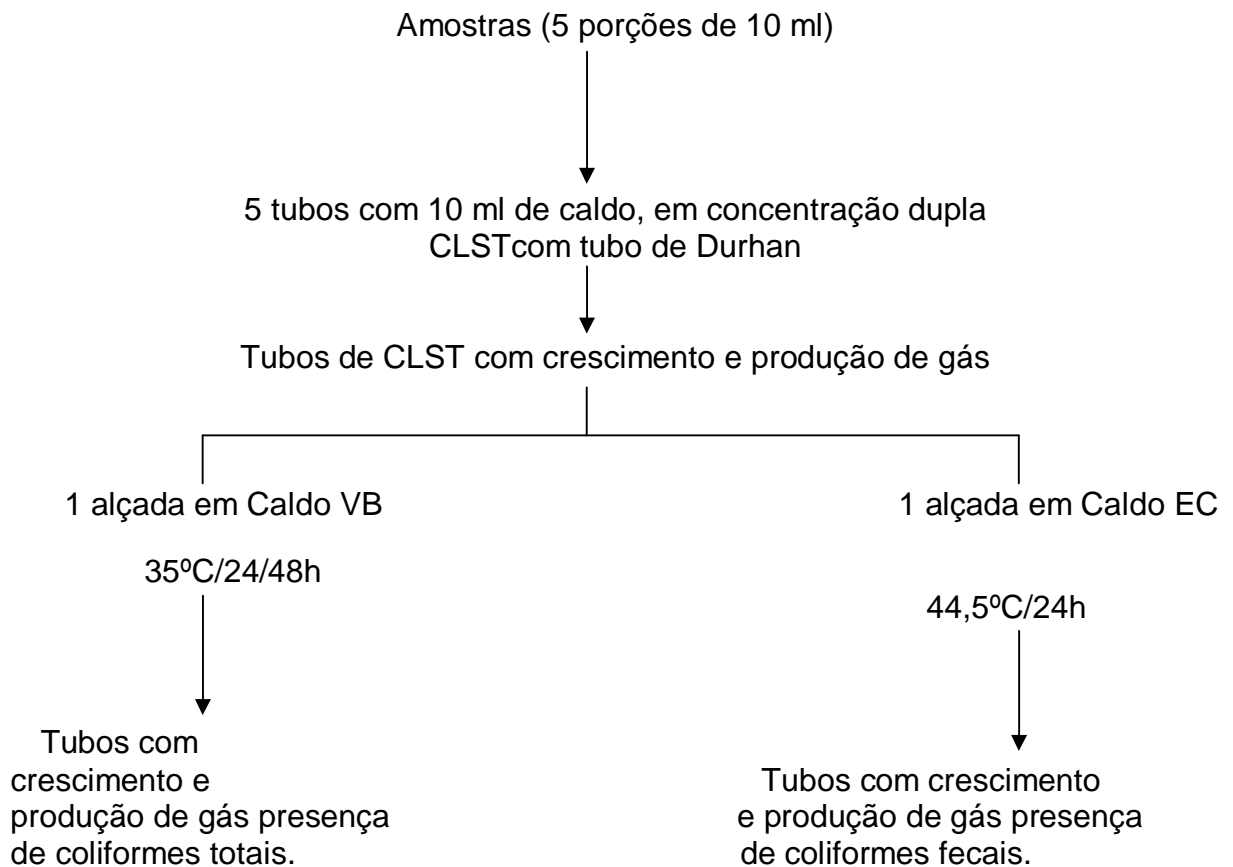
O fluxo laminar antes de ser utilizada foi muito bem higienizado, sendo limpo com uma esponja adequada e detergente, tomando-se todo cuidado para que não ficasse resíduo de sabão e finalizando a higienização com uma flanela nova embebida com álcool a 70%. O fluxo laminar é utilizado para o controle de micro-organismos presentes no ar, principalmente em espaços fechados (PELCZAR, *et al.*, 1996).



Figura 10 – Preparo das amostras para inoculação no fluxo laminar.

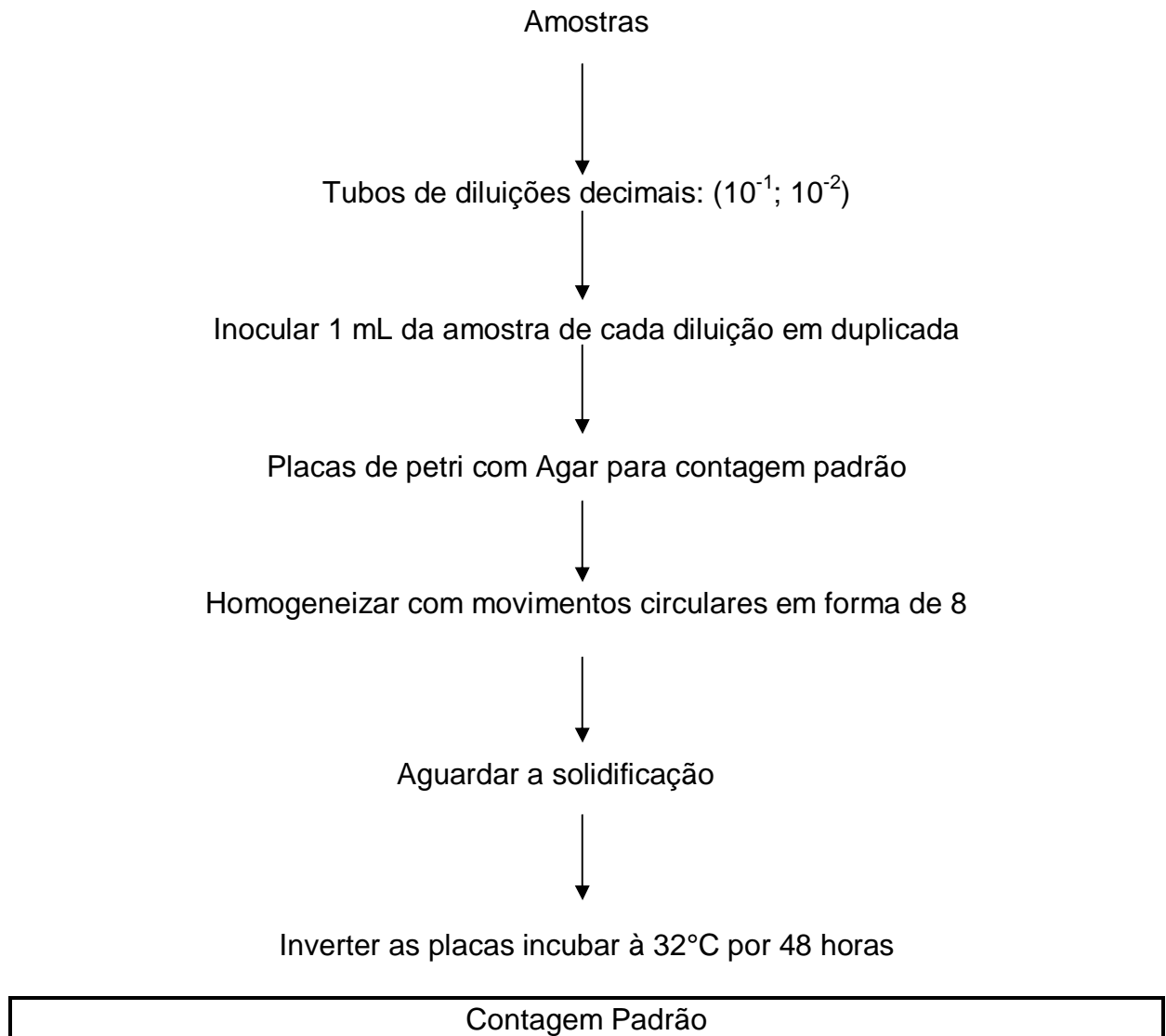
3.4.3.1 – FLUXOGRAMA DAS ANÁLISES

3.4.3.1.1 – Coliformes Totais e Fecais – Técnica dos Tubos Múltiplos

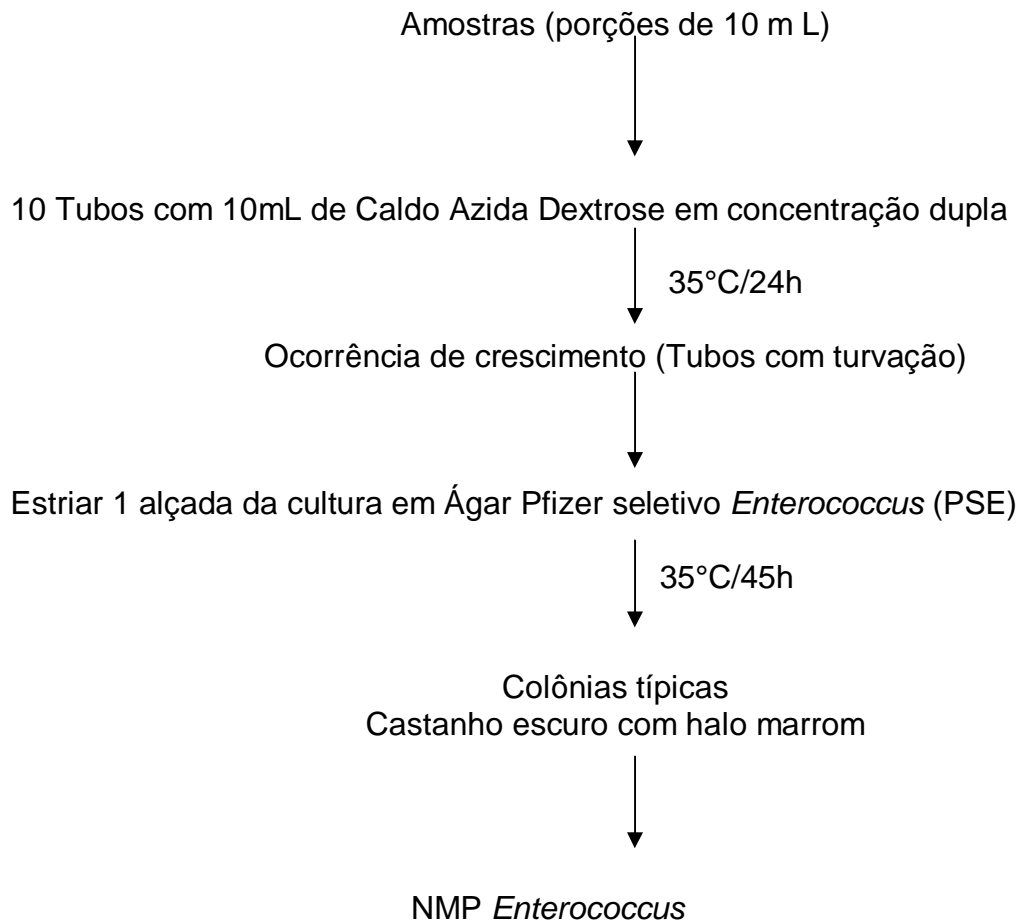


Técnica dos Tubos Múltiplos

3.4.3.1.2 - Identificação de Bactérias Mesófilas – Técnicas de Plaqueamento em Profundidade (Pour Plate).

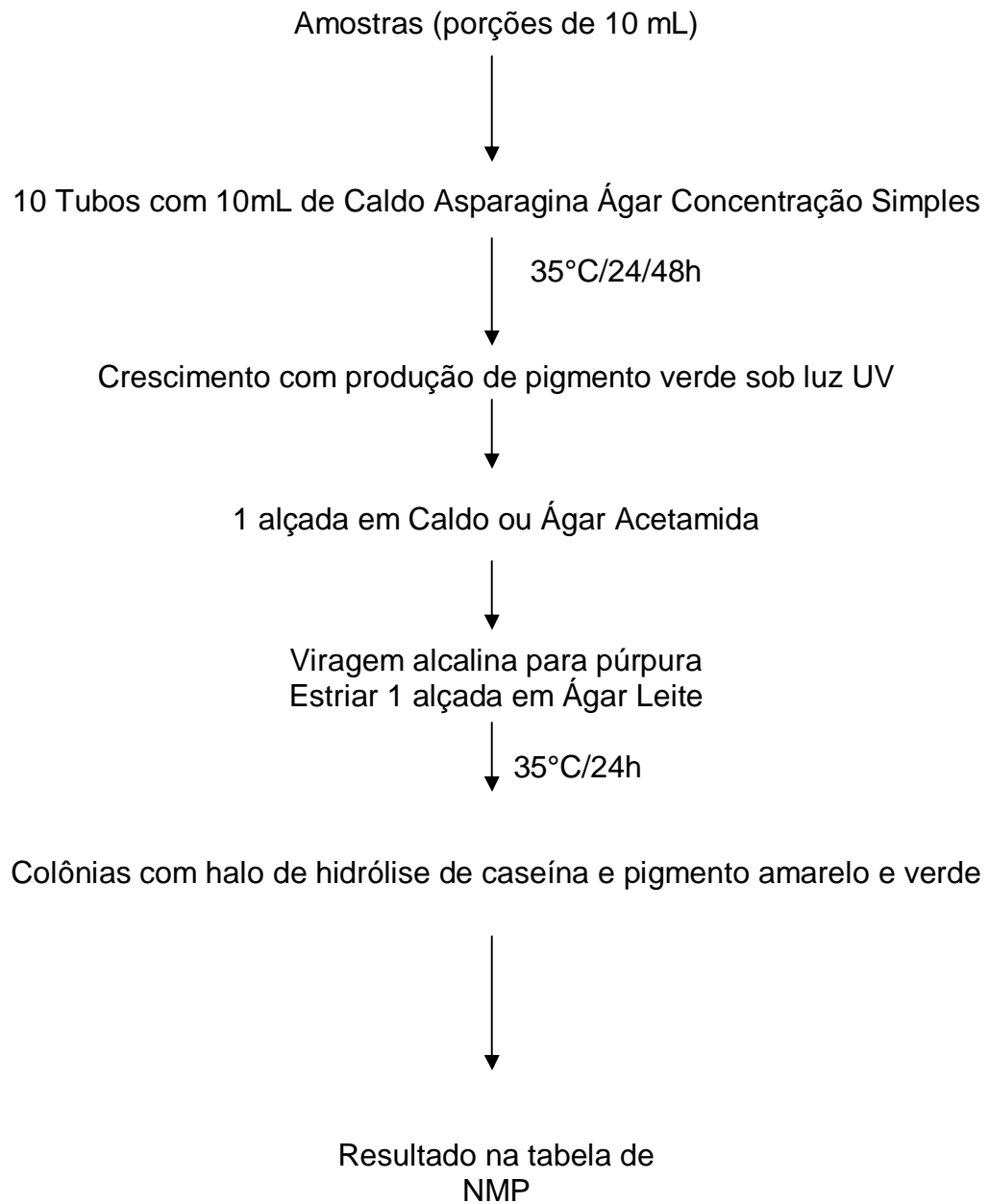


3.4.3.1.3 – *Enterococcus* – Técnica dos Tubos Múltiplos



Número mais provável de *Enterococcus* pela técnica dos tubos múltiplos.

3.4.3.1.4 – *Pseudomonas* – Técnicas dos Tubos Múltiplos



4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

De acordo com as coletas realizadas para as análises foram observadas as datas de higienização de cada bebedouro.

A Tabela 5 mostra as datas de higienização dos bebedouros em cada ponto de coleta.

MÊS	DATA	LOCAL – SALA
Março	05/03/2011 22/03/2011	Telefone/ Administração/ Professores e CEPECI
Abril	05/04/2011 20/04/2011	Telefone/ Administração/ Professores e CEPECI
Maio	07/05/2011 20/05/2011	Telefone/ Administração/ Professores/ CEPECI
Junho	14/06/2011 05/06/2011	Telefone/ Administração/ Professores e CEPECI

TABELA 5- Data de higienização dos bebedouros

Somente nos dias 22/03/2011 e 05/04/2011 coincidiram as coletas com a data de higienização dos bebedouros, já os outros dias de coleta tiveram uma diferença mínima com dias das higienizações dos bebedouros.

Na coleta realizada no dia 22/04/2011 na sala de administração não havia água, porém foi pedido para que um funcionário fizesse a troca, a higienização feita nesse momento. O procedimento de limpeza não foi efetuado corretamente, foi passado somente uma flanela embebida com álcool 70% e o lacre foi retirado com um estilete de uso diário da funcionária.

O armazenamento dos galões adquiridos é de extrema importância visto que não se deve armazenar os galões em qualquer lugar.

Os galões devem estar protegidos da incidência direta de luz solar mantida sobre paletas ou prateleiras limpas e secas reservado só para esse fim. verificou-se que o armazenamento dos galões utilizados na FEMA não estão de acordo com as normas (Figura 11).



Figura 11 – Local de armazenamento de galões de água impróprio.

Os resultados foram avaliados comparando-se com os padrões estabelecidos na RDC N° 275, 22 de setembro de 2005 da ANVISA. As amostras foram classificadas em aprovadas ou reprovadas.

As amostras foram inoculadas dentro do fluxo laminar com o máximo de cuidado para que não ocorresse risco de contaminação decorrente de manipulação.

4.1 – TESTES CONFIRMATIVOS

Foram realizados testes confirmativos nas amostras que apresentaram resultados positivos nos testes presuntivos.

Nas amostras que apresentaram resultados presuntivos positivos para Coliformes Totais e Fecais, realizaram-se testes de Caldo Verde brilhante (VB) para uma confirmação mais precisa de coliformes totais, e o teste no caldo *E.coli* (EC) para a confirmação de coliformes fecais.

4.1.1 – Análises de Coliformes Totais e Fecais

Das 16 amostras analisadas, apenas 02 apresentaram características positivas no teste presuntivo em CLST. De cada tubo positivo, inoculou-se alçadas em tubos de VB para confirmação de coliforme total e em EC para confirmação de coliforme

fecal. Conforme indicado nas Figuras 12,13 (A), 13 (B) e 13 (C).



Figura 12 – (A) Esterilização da alça de platina em bico de bunsen (B) Teste confirmativo de Coliformes totais e Fecais em tubos de VB (caldo verde brilhante) e EC (caldo *E. coli*).



Figura 13 (A) – Resultados EC negativo para Coliforme Fecal não desprendimento de gás.

Figura 13 (B) – Resultado VB negativo para Coliforme Totais não desprendimento de gás.

Figura 13 (C) – Resultado VB positivo para Coliforme Totais com desprendimento de gás.

4.1.2 - Análises Realizada para *Enterococcus*

Das 32 amostras analisadas (Figuras 14A e B) 02 foram submetidas aos testes confirmativos, estriando-se em placas com cultura de Agar-Base (PSE), onde ocorreu ausência da mesma.

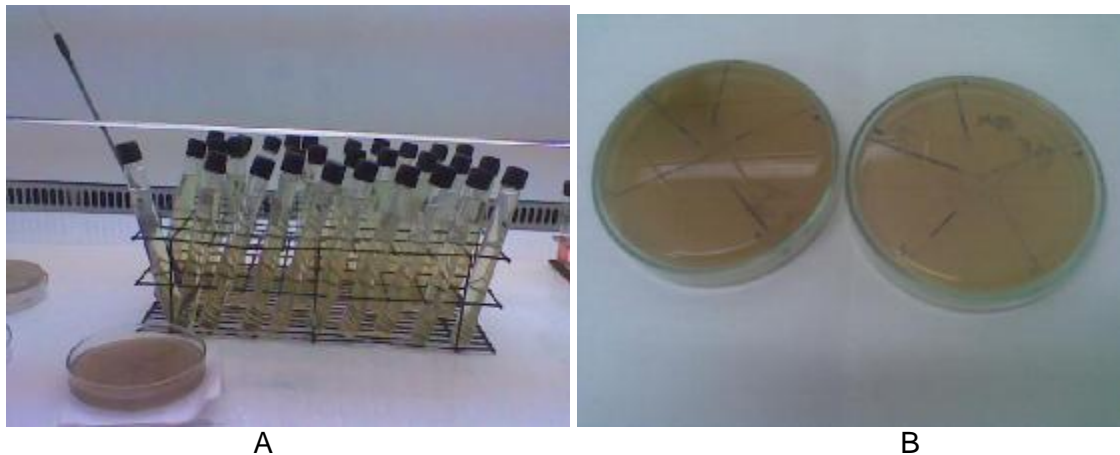


Figura 14 – (A) Teste presuntivo – positivo de *Enterococcus*.
Figura 14 - (B) Teste Confirmativo – negativo de *Enterococcus*.

4.1.3 - Análises Realizadas para *Pseudomonas aeruginosa*

De acordo com as Figura 15, grande maioria das amostras positivaram no teste presuntivo, realizado-se testes confirmativos através do Caldo Asparagina e Acetamida.



Figura 15 – Identificação dos meios: Caldo Asparagina (incolor) / Caldo acetamida (vermelho).

Nos testes confirmativos realizados para Asparagina houve crescimento e produção de um pigmento verde fluorescente sob luz ultravioleta (Figura 16B). E observou-se também em acetamida há ocorrência de crescimento com viragem alcalina do indicador, mudando a cor de meio de vermelho para púrpura.

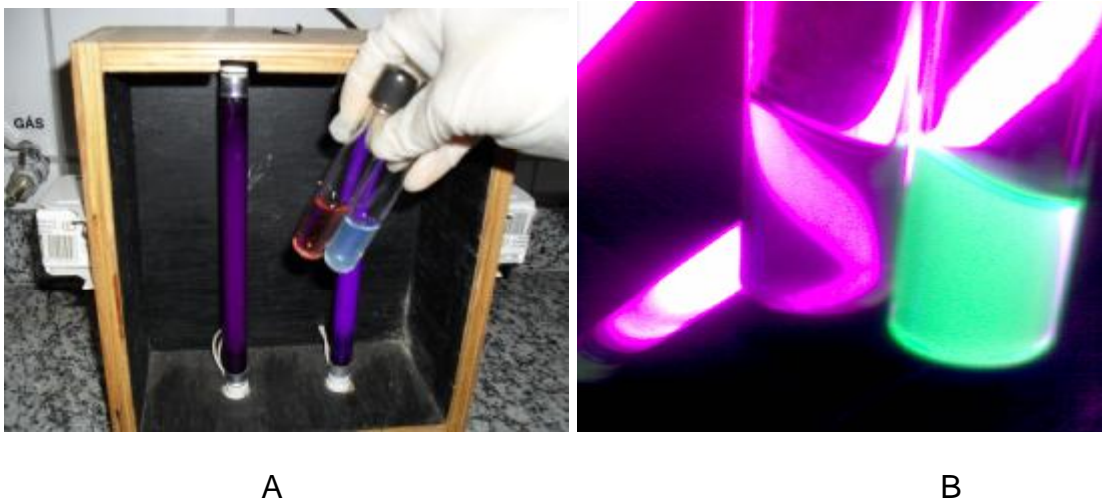
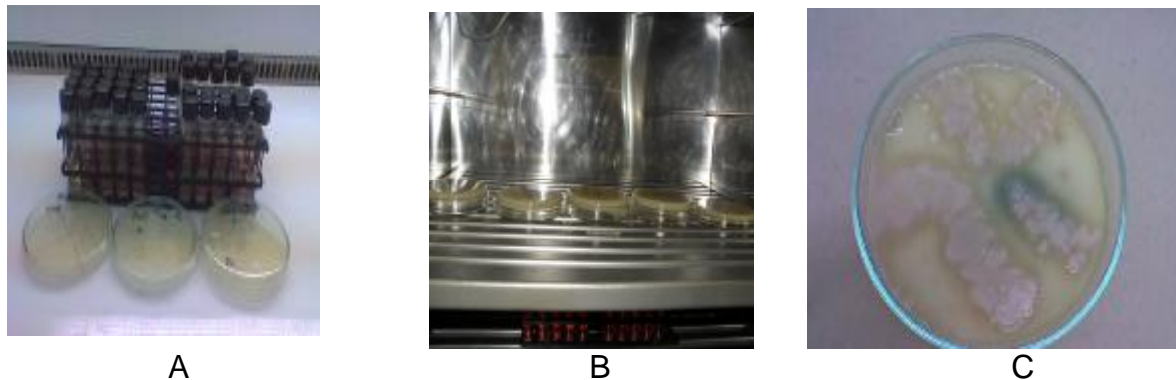


Figura 16 – (A): Teste presuntivo negativo na luz ultravioleta de acetamida e asparagina. (B): Teste presuntivo positivo na luz ultravioleta de acetamida e asparagina.

Partindo-se dos tubos com viragem alcalina do indicador dos tubos de acetamida, estriou-se uma alçada de cada cultura em placa de Agar Leite, incubando-se as placas a 35°C/24h e observou-se a ocorrência de hidrólise da caseína, evidenciada por um halo claro em redor das colônias (Figura 17C), e a produção de um pigmento

verde que difunde pelo meio de cultura, característica confirmativas de *P.aeruginosa*.



**Figura 17- (A) e (B): Placas de Agar Leite estriada com amostra de água.
(C): Placas de Agar Leite teste confirmativo após 24 horas.**

As provas para *Pseudomonas aeruginosa* foram características. De acordo com a Legislação à presença de *Pseudomonas aeruginosa* na água.

4.1.4 – Análise de Contagem Padrão

Para água mineral não tem um padrão específico para contagem de microrganismos mesófilos, mas para água de poço conforme a portaria Nº 518, de 25 de março de 2004, o valor máximo é de 5×10^2 UFC/100 mL.

As amostras foram diluídas em séries de Contagem padrão para identificação de micro-organismos mesófilos aeróbios. O resultado da maioria das amostras deram dentro dos padrões.

Após a inoculação das placas em uma estufa a 32°C por 48 horas (Figuras 18 A e B), observou-se um crescimento considerável em algumas amostras (Figuras 19 A, B e C).

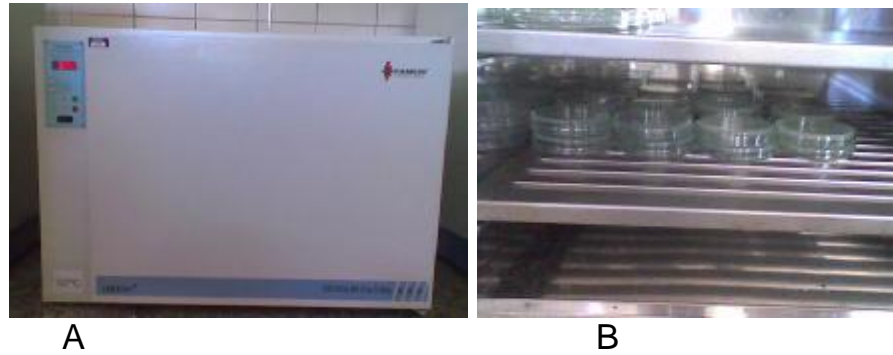


Figura 18 – (A): Estufa de 32°C (B): Placas incubadas.

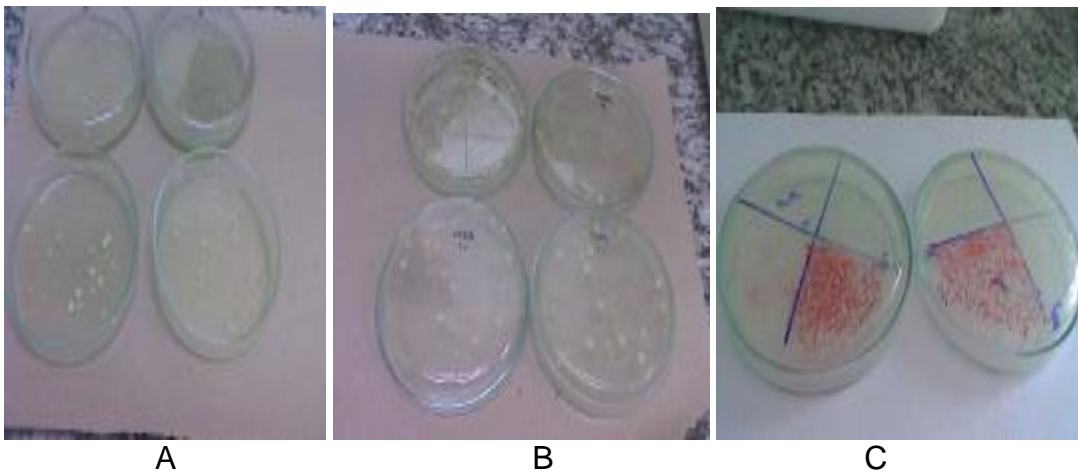


Figura 19 – Amostras (A e B): Micro-organismo Mesófilos (C): Placas divididas para contagem .

4.2 – TABELAS: RESULTADOS ÁGUA MINERAL

As Tabelas de 6 à 9 apresentam os resultados finais das análises microbiológica das 16 amostras de água mineral analisadas.

Dias	Coliforme Fecal	Coliforme Total	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Contagem De bactérias mesófilas	<i>Enterococcus</i>
08/03/2011	Ausente	Ausente	Ausente	$1,6 \times 10^3$	Ausente
22/03/2011	Ausente	Ausente	Presente	$1,4 \times 10^3$	Ausente
05/04/2011	Ausente	Ausente	Presente	$5,7 \times 10^3$	Ausente
22/04/2011	Ausente	Ausente	Presente	$3,6 \times 10^3$	Ausente
10/05/2011	Ausente	Ausente	Presente	$6,5 \times 10^3$	Ausente
24/05/2011	Ausente	Ausente	Presente	$6,9 \times 10^3$	Ausente
07/06/2011	Ausente	Ausente	Presente	$7,9 \times 10^3$	Ausente
21/06/2011	Ausente	Ausente	Presente	$6,8 \times 10^3$	Ausente

Tabela 6 – Resultados das Análises microbiológicos da Sala de Telefone

Dias	Coliforme Fecal	Coliforme Total	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Contagem De bactérias mesófilas	<i>Enterococcus</i>
08/03/2011	Ausente	Ausente	Ausente	9,7 x10 ³	Ausente
22/03/2011	Ausente	Ausente	Presente	8,7 x10 ³	Ausente
05/04/2011	Ausente	Ausente	Presente	1,2 x10 ³	Ausente
22/04/2011	Ausente	Ausente	Presente	1,6 x10 ³	Ausente
10/05/2011	Ausente	Ausente	Presente	3,0 x10 ³	Ausente
24/05/2011	Ausente	Ausente	Presente	4,0 x10 ³	Ausente
07/06/2011	Ausente	Ausente	Presente	8,5 x10 ³	Ausente
21/06/2011	Ausente	Ausente	Presente	8,7 x10 ³	Ausente

Tabela 7 – Resultados das Análises microbiológica as Sala de Administração

Dias	Coliforme Fecal	Coliforme Total	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Contagem De bactérias mesófilas	<i>Enterococcus</i>
08/03/2011	Ausente	Ausente	Ausente	1,1 x10 ³	Ausente
22/03/2011	Ausente	Ausente	Presente	1,2 x10 ³	Ausente
05/04/2011	Ausente	Ausente	Presente	2,1 x10 ³	Ausente
22/04/2011	Ausente	Ausente	Presente	2,9 x10 ³	Ausente
10/05/2011	Ausente	Ausente	Presente	2,4 x10 ³	Ausente
24/05/2011	Ausente	Ausente	Presente	3,9 x10 ³	Ausente
07/06/2011	Ausente	Ausente	Presente	5,2 x10 ³	Ausente
21/06/2011	Ausente	Ausente	Presente	7,0 x10 ³	Ausente

Tabela 8 – Resultados das Análises microbiológicos da Sala dos professores:

Dias	Coliforme Fecal	Coliforme Total	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Contagem De bactérias mesófilas	<i>Enterococcus</i>
08/03/2011	Ausente	Ausente	Ausente	1,4 x10 ³	Ausente
22/03/2011	Ausente	Ausente	Ausente	1,4 x10 ³	Ausente
05/04/2011	Ausente	Ausente	Presente	2,6 x10 ³	Ausente
22/04/2011	Ausente	Ausente	Presente	2,1 x10 ³	Ausente
10/05/2011	Ausente	Ausente	Presente	1,1 x10 ³	Ausente
24/05/2011	Ausente	Ausente	Presente	1,6 x10 ³	Ausente
07/06/2011	Ausente	Ausente	Presente	5,2 x10 ³	Ausente
21/06/2011	Ausente	Presente	Presente	6,2 x10 ³	Ausente

Tabela 9 – Resultados das Análises microbiológicos da Sala do Laboratório do CEPECI:

De acordo com a Resolução nº 275, 22 de setembro de 2005, para água mineral,

devem estar ausentes bactérias do grupo Coliforme totais e fecais, *Enterococcus* e *Pseudomonas aeruginosa* quanto aos padrões microbiológicos.

O fato de haver amostra positiva para coliforme pode demonstrar que a contaminação ocorreu por falta de higienização adequada.

De acordo com os indicadores utilizados para avaliação microbiológica para água mineral, regulamentado pela Legislação brasileira, as amostras avaliadas neste estudo mostraram que 90% foram satisfatórias para coliformes totais, fecais e *Enterococcus*.

A resolução RDC nº 275, de 22/09/2005 não prevê padrão para micro-organismos mesófilos aeróbios, portanto todas as amostras analisadas estas de acordo com o padrão. Porém se analisarmos os resultados com base na Portaria do MS nº 518 de 25/03/2004, todas as amostras apresentaram contagem acima de 5×10^2 UFC/mL.

Sant'ana *et al.* (2003), analisaram 44 amostras de galões de 20 L proveniente dos estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro. Os resultados obtidos reprovaram 25% das amostras por apresentarem *E. coli*. Diferentemente dos resultados obtidos neste trabalho, os autores não detectaram a presença de *Pseudomonas aeruginosa*.

ALVES *et al.*, 2002, analisaram 18 amostras de água mineral e galões de 20L na cidade de Marília – SP. Apenas uma amostra (5,55%) apresentou contaminação por Coliforme total. Os parâmetros *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus* não foram analisados.

Silva *et al.*, 2008 analisaram 10 marcas de águas minerais acondicionadas em galões de 20 L, no estado de Pernambuco, para análise de bactérias mesófilas tomando como base na Portaria nº 518. Verificou se havia uma porcentagem de (65%) excedente no limite permitido de 500 UFC mL^{-1} .

Guimarães (2006), analisou 15 diferentes marcas de água mineral em embalagem de 1,5 L e de 500 mL da cidade de Goiânia. Seis das marcas analisadas apresentaram contaminação por coliformes totais, cinco por coliformes fecais e uma por *Pseudomonas aeruginosa*. Comparando com este trabalho, o nível de aprovação para coliformes totais e fecais foram de 90% satisfatórios, enquanto para

Pseudomonas 84,4% insatisfatório.

Nas amostras analisadas neste trabalho, 84,4% apresentaram presença de *Pseudomonas aeruginosa*, sendo reprovadas para o consumo humano. Essa contaminação pode ocorrer no momento da captação ou do envase da água mineral.

5 – CONCLUSÃO

Os parâmetros qualitativos avaliados para verificação de qualidade da Água Mineral no galão de 20L adquirido pela Instituição Educacional do Município de Assis foram: *Coliformes Totais e Fecais*, *Enterococcus*, *Pseudomonas aeruginosa* e Contagem de mesófilos.

Os resultados das 32 amostras de água mineral mostraram que 90% das análises foram satisfatórias para análises de Coliformes Fecais e Totais e *Enterococcus*, ou seja de acordo com a Resolução nº 275, de 22 de setembro de 2005 – ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

Os resultados de Contagem padrão da água mineral não é um padrão a ser seguido pela RDC nº 275. Comparando-se o padrão para água de poço, 10% estariam reprovada, ou seja impróprias para consumo de acordo com a Portaria nº 518, de 25 de março de 2004 que estipula no máximo 500 UFC/mL.

As análises para *Pseudomonas aeruginosa* apresentaram resultados insatisfatórios, mostrando que 84,4% das amostras estão impróprias para consumo humano, de acordo com a Resolução nº 275 de 22 de setembro de 2005 – ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária que estabelece Ausência / 100 mL.

Verificou-se que o armazenamento dos galões é feita de maneira inadequada, no chão na porta de entrada do almoxarifado da Instituição onde a um risco de contaminação.

Visto que este trabalho teve como intuito de mostrar a qualidade da água mineral adquirida pela Instituição, o único resquício de providências tomada foi de cobrar a higienização por parte dos funcionários. Mas o armazenamento continua inadequado e as entregas dos galões também.

REFERÊNCIAS

_____ **Água Mineral** – Wikipédia a enciclopédia livre. <Disponível em: http://www.pt.wikipédia.org/wiki/água_mineral>. Acesso em 05 julho de 2010.

_____ **Água Mineral. Meio Ambiente.** <Disponível em: www.meioambiente.pro.br/agua/.../aguamineral.htm>. Acesso em 05 julho de 2010.

_____ **Consumo de água mineral cresce mais de 5,6 % em duas décadas.** <Disponível em: www.hannabrasil.com/.../208-consumo-de-agua-mineral-cresce-em-duas-decadas>. Acesso em 06 julho de 2010.

_____ **Coliforme fecal.** <Disponível em: www.wikipédia.org/wiki/coliforme_fecal> Acesso em 11 julho de 2010.

_____ **Captação.** <Disponível em: <http://www.aguamineralviva.com.br/captacao.htm>> Acesso em 06 julho de 2010.

_____ **Consumo de água mineral cresce mais de 5,6 % em duas décadas.** <Disponível em: www.hannabrasil.com/.../208-consumo-de-agua-mineral-cresce-em-duas-decadas>. Acesso em 06 julho de 2010.

_____ **Educação Ambiental através do controle de Qualidade da água.** <Disponível em www.iff.edu.br/campus/.../educacao-ambiental/disciplinas-e-ementas>. Acesso em 2 de abril de 2011.

_____ **Envase.** <Disponível em: <http://www.pt.wikilingue.com/es/envase>>. Acesso em 10 julho de 2010.

_____ **Exotoxina, imunológico.** <Disponível em: WWW.unicamp.br/cipoi/lic/glossrio.htm. Acesso em 21 de julho de 2010.

ABINAM - Associação Brasileira de Indústria de Água Mineral. <Disponível em: http://www.abinam.com.br/lermais_materiais.php?cd>. Acesso em 05 de julho de 2010.

ALVES, N. C., ODORIZZI, A. C., 2002. **Análise microbiológica de águas minerais e de água potável de abastecimento, Marília-SP.** Revista Saúde Pública. <Disponível em www.scielo.br/pdf/rsp/y36n6/13531.pdf> Acesso em: 20 maio de 2011.

Ambiente Brasil. **A Origem da Água mineral.** <Disponível em: http://ambientes.ambientebrasil.com.br/agua/...agua_mineral/a_origem_da_agua_mineral.html>. Acesso em 20 de julho de 2010.

ANVISA. **Processo de captação e envase de água mineral.** RDC 275, de 22 de setembro de 2005 <Disponível em: http://www.cetesb.sp.gov.br/solo/agua_sub/arquivo/rdc_275_2005.pdf>. Acesso em 06 julho de 2010.

AROCHA, M. M. Behavior of hemonhagic *Escherichia coli* during the manufacture of cottage cheese. **Journal of Food Protection**, v. 55, n. 5, p. 379-381, 1992.

ARRUDA, Érico de Antônio Gomes de. **Infecção hospitalar por *Pseudomonas aeruginosa* multi-resistente: análise epidemiológica no HC-FMUSP**. 1996. 504p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina – Universidade de São Paulo, São Paulo Brasil, 1996.

BIANCARELLI, Aureliano. **Médicos lançam campanha para combater septicemia**. <Disponível em: www1.folha.uol.com.br/folha/.../ult263u3574.shtml. Acesso em 21 julho de 2010.

BLACK, JACQUELYN G. **Microbiologia – Fundamental e Perspectivas**. 4ª Ed. Tradução Black, Editora Guanabara/ Koogan, 2002.

CMB Consultoria: Mineração e Meio Ambiente. **Logística de água mineral é regulamentada pela ANVISA**. Julho/2007. <Disponível em: www.cmbconsultoria.com.br/.../anvisa-regulamenta-transporte-distribuicao-armazenamento-e-comercio-de-agua-mineral>. Acesso em 10 julho de 2010.

CORREIA, Luiz Alberto da Silva. COSTA, Cíntia Buarque de Souza. MILITO, Claudia Maria. DANTAS, Anderson de Barros. **Processo de extração de água mineral**. <Disponível em: http://www.aedb.br/seget/artigo07/1384_Artigo_Seget.pdf>. Acesso em 10 julho de 2010

COSTA, Humberto. **Ministério da saúde Portaria nº 518, de 25 de março de 2004**. <Disponível em: www.agrolab.com.br/portaria%20518_04.pdf>. Acesso em 20 de outubro de 2010.

DIAS, Maria Fernanda Falcone. **Qualidade microbiológicas de águas minerais em garrafas individuais comercializadas em Araraquara – SP.** 66p . Dissertação (Pós Graduação) Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho. Faculdade de Ciências Farmacêuticas Campus de Araraquara, 2008. <Disponível em: www.fcfar.unesp.br/posgraduacao/.../maria_falcone-completo.pdf>. Acesso em 20 de julho de 2010.

FURBINO, Zulmira . **Economia de água em bares e restaurantes dobra em BH, 2010.** <Disponível em: www.uai.com.br/...economia-agua-em-bares-e-restaurantes-dobra-em-BH> Acesso em 20 julho de 2010.

GUIMARÃES, A. P. R. C. **Avaliação Microbiológica de amostras de água mineral natural, sem gás, envasada, comercializada em Goiania-GO** - Instituto de Patologia. 2006 www.iptsp.ufg.br/posgraduacao/concluintes/pdf/AnaPaula-2006.pdf. Acesso em: 20 de maio de 2011.

LIMA, Daniel . **IDEC reprova água mineral do Piauí.** <Disponível em: www.acessepiaui.com.br/geral/idec-reprova.../8733.htm>. Acesso em 20 de julho de 2010

PADILLA, Andres. **Consumo de água mineral de Cuiabá – 08/09/2007.**<Disponível em : www.turismocuiaba.com.br>. Acesso em 20 de julho de 2010.

PELCZAR, Micahel Jr; CHAN, E.C.S; KRIE, Noel R. **Microbiologia Conceito e Aplicações.** 2ª ed. Tradução Sueli Fumie Yamada, Tânia Ueda Nakamura, Benedito Prado Dias Filho. São Paulo: Editora Makron Books, 1996.

PICCININI, Ane Denise. **Consumo de água e seu uso racional 2008**. <Disponível em: http://www.consumo_agua_uso_racional.html>. Acesso em: 19 de julho de 2010.

Sant'ana A.S., Shênia C.F.L., Silva S.C.F.L., Ivan O.Jr., Farani I.O.Jr, Carlos H.R. Qualidade microbiológica de águas minerais, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 2003; 3 (Supl):190-4. Dez. 2003. <Disponível em: WWW.scielo.br/pdf/cta/v23s0/19495.pdf>. Acesso em 20 de maio de 2011.

SILVA, Neusely da. NETO, Romeu Cantúcio. JUNQUEIRA, Valéria C.A. SILVEIRA, Neliane Ferraz de Arruda. **Manual de análise microbiológica de água**. 20 ed. Tradução Jairo Porfírio. São Paulo: Editora Varela Editora e Livraria LTDA, 2005.

SILVA, V. P., FERREIRA, D. N., RAMOS, N. P., 2008. Estudo da qualidade microbiológica de 10 amostras de água mineral natural envasadas por uma empresa de mineração da cidade de João Pessoa-PB. **XI Encontro de iniciação adocência**. <Disponível em: www.prac.ufpb.br/anais/lcbeu_anais/anais/saude/aguasminerais.pdf>. Acesso em: 20 de maio de 2011.

TRABULS, Luiz Rachid; Alterthum, Flávio. **Microbiologia**. 4ª Ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2005.