



# Sobrevivência e desenvolvimento de *Pseudomonas aeruginosa* em água mineral experimentalmente contaminada

## Survival and growth of *Pseudomonas aeruginosa* in experimentally contaminated mineral water

RIALA6/1777

Ana Paula de SOUZA, Ruth Estela Gravato ROWLANDS, Cecília Geraldine MARTINS, Ana Paula Ramalho de PAULA, Christiane Asturiano RISTORI\*

\*Endereço de correspondência: Núcleo de Microbiologia, Centro de Alimentos, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 355, Cerqueira César, São Paulo, SP, CEP: 01246-902. E-mail: [car@alumni.usp.br](mailto:car@alumni.usp.br)

Recebido: 03.10.2018 - Aceito para publicação: 02.07.2019

### RESUMO

*Pseudomonas aeruginosa*, agente patogênico oportunista, é frequentemente encontrado em águas minerais e pode causar infecções em indivíduos imunocomprometidos. Neste estudo foi avaliada a sobrevivência e/ou a multiplicação de *P. aeruginosa* em amostras de água mineral em embalagens plásticas de 1,5 L e 20 L, experimentalmente contaminadas, armazenadas a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $4 \pm 2^\circ\text{C}$  e em temperatura ambiente ( $20\text{-}25^\circ\text{C}$ ), durante o período de validade do produto. Nas amostras de água mineral em garrafa plástica de 1,5 L, armazenadas a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  e  $4 \pm 2^\circ\text{C}$ , a população de *P. aeruginosa* manteve-se viável durante 370 e 100 dias, respectivamente. O maior aumento da população bacteriana ocorreu nas amostras de água mineral em galão de 20 L, armazenadas entre 20 a  $25^\circ\text{C}$ , que passou de 3,8 para 6,6  $\log_{10}$  UFC/mL em um período de sete dias. Portanto, os galões de 20 L merecem atenção especial, pois além de serem retornáveis, normalmente são armazenados à temperatura ambiente. Os resultados reforçam a necessidade das empresas de águas minerais implantarem e implementarem as Boas Práticas de Fabricação (BPF) e o sistema Análise de Perigo e Pontos Críticos de Controle (APPCC) para eliminar ou minimizar os riscos do consumo deste produto.

**Palavras-chave.** *Pseudomonas aeruginosa*, água mineral, sobrevivência, qualidade da água.

### ABSTRACT

*Pseudomonas aeruginosa*, an opportunistic pathogen, is often found in bottled waters and capable of infecting the immunocompromised patients. The present study aimed at evaluating the survival and/or the growth of *P. aeruginosa* strain in 1,5 L and 20 L bottled mineral water samples experimentally contaminated, stored at  $35 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $4 \pm 2^\circ\text{C}$ , and at room temperature (from 20 to  $25^\circ\text{C}$ ) during the product shelf-life period. In the mineral water samples contained in 1.5 L bottles, stored at  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  and  $4 \pm 2^\circ\text{C}$ , *P. aeruginosa* remained viable for 370 and 100 days, respectively. The major increase in the bacterial population occurred in mineral water samples in 20 L bottles stored at 20 to  $25^\circ\text{C}$ , being from 3.8 to 6.6  $\log_{10}$  CFU/mL, in a period of seven days. Therefore, the 20 L bottles deserve a special attention because, in addition of being returnable, they are usually stored at room temperature. The results reinforce the need of the mineral water companies in implementing the Good Manufacturing Practice (GMP) and the HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point) to eliminate and to minimize the risks of consuming the contaminated product.

**Keywords.** *Pseudomonas aeruginosa*, mineral water, survival, water quality.

## INTRODUÇÃO

O aumento considerável no consumo de água engarrafada tem sido observado mundialmente, devido à percepção do consumidor em relação ao produto como uma alternativa saudável à água de abastecimento público<sup>1</sup>. Neste cenário, o Brasil destaca-se como o quarto maior produtor de água engarrafada, segundo a Associação Brasileira da Indústria de Água Mineral (ABINAM)<sup>2</sup>.

Entretanto, a água mineral não é um produto estéril e pode apresentar micro-organismos autóctones como *Pseudomonas aeruginosa* e os organismos alóctones, não provenientes da fonte que podem aparecer nas etapas de pré-engarrafamento e processamento<sup>3</sup>. Durante as etapas de processamento, o número de bactérias pode aumentar de  $10^3$  para  $10^6$  UFC/mL<sup>4,5</sup>, provavelmente devido ao aumento do nível de oxigênio<sup>5</sup> ou pelo contato com compostos orgânicos que podem estar presentes em tubulações, reservatórios ou nas embalagens e tampas<sup>6</sup>.

A presença de *P. aeruginosa* em águas minerais já foi relatada em vários países, incluindo o Brasil<sup>7-14</sup>, indicando que a fonte está poluída por material orgânico ou que o produto foi contaminado durante o processo de engarrafamento<sup>15</sup>.

O consumo de águas minerais contaminadas com *P. aeruginosa* pode representar um risco potencial para indivíduos imunocomprometidos<sup>16</sup> devido à característica oportunista deste micro-organismo e sua capacidade em desenvolver multirresistência a agentes antimicrobianos<sup>17</sup>. Este micro-organismo é uma das principais causas de infecções hospitalares com alta taxa de mortalidade<sup>18</sup>, podendo causar infecção do trato urinário, infecção do sistema respiratório, dermatites, infecção de tecidos moles, bacteremia e uma variedade de infecções sistêmicas, particularmente em pacientes queimados e imunocomprometidos<sup>19</sup>. *P. aeruginosa* possui a capacidade de formar biofilmes que representam sérios problemas para as empresas de água mineral e, principalmente, em ambientes hospitalares<sup>20</sup>. Além disso, podem sobreviver e se multiplicar em condições adversas como ambientes com poucos nutrientes<sup>15, 20, 21</sup>.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a sobrevivência e/ou multiplicação de *P. aeruginosa*

em amostras de água mineral em embalagens de 1,5 L e 20 L, experimentalmente contaminadas e armazenadas a  $4 \pm 2^\circ\text{C}$ ,  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  e em temperatura ambiente ( $20$  a  $25^\circ\text{C}$ ), durante o período de validade do produto.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Cepa

A cepa de *P. aeruginosa* utilizada no experimento foi isolada de uma amostra de água mineral analisada pelo Núcleo de Microbiologia, do Instituto Adolfo Lutz Central e mantida em ágar gelose conservação à temperatura ambiente até o momento da realização dos experimentos.

### Amostras

Os experimentos foram realizados em nove amostras de água mineral acondicionadas em embalagem original, sendo seis amostras em embalagem de 1,5 L em garrafas de polietileno tereftalato (PET), com prazo de validade de 12 meses, e três em galões de 20 L de cloreto de polivinila (PVC), com validade de três meses. As amostras foram adquiridas no comércio da cidade de São Paulo e eram todas do mesmo lote de acordo com a embalagem.

### Metodologia

#### Preparação do inóculo

O inóculo foi preparado de acordo com Legnani et al<sup>15</sup>, com modificações. A cepa de *P. aeruginosa* foi reativada em caldo BHI (Brain Heart Infusion Broth) e incubada a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  por 24 h. Em seguida uma alíquota de 0,1 mL desta cultura foi transferida para 3 mL de solução tampão fosfato estéril (pH 7,2), homogeneizada e centrifugada à 1166 g (5000 rpm) por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foram adicionados 3 mL de solução tampão fosfato, sendo este o inóculo inicial ( $10^9$ ) utilizado para contaminação das amostras de água mineral de 1,5 L.

Para as amostras de água mineral em galões de 20 L, realizou-se o mesmo procedimento descrito acima, utilizando-se uma alíquota de 0,4 mL da cultura em 12 mL de solução tampão fosfato e após centrifugação e descarte do sobrenadante,

adicionou-se 12 mL de solução tampão fosfato, sendo este o inoculo inicial ( $10^0$ ).

A concentração final de micro-organismo em cada amostra, após a inoculação, foi de aproximadamente  $10^3$  UFC/mL.

### Contaminação Experimental

Antes das análises microbiológicas e contaminação experimental, as embalagens foram lavadas, externamente, com água e sabão e desinfetadas com solução de álcool 70%.

Em seis amostras de água mineral de 1,5 L, inoculou-se uma alíquota de 1 mL do inoculo inicial, com auxílio de uma seringa estéril. O mesmo procedimento foi realizado para as três amostras de água mineral em galões de 20 L, sendo que o volume utilizado para contaminação foi de 10 mL.

Após contaminação experimental de cada amostra, procedia-se a homogeneização, no mínimo 25 vezes, por inversão. Três amostras de água mineral de 1,5 L foram mantidas em estufa bacteriológica a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$ , as outras três amostras em refrigerador a  $4 \pm 2^\circ\text{C}$  e as três amostras de água mineral em galões de 20 L foram mantidas à temperatura ambiente ( $20$  a  $25^\circ\text{C}$ ).

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os dados foram expressos com a média da contagem microbiana dos mesmos.

### Análises microbiológicas

Aleatoriamente escolheu-se uma amostra controle (não contaminada experimentalmente), do mesmo lote de cada embalagem, de 1,5 L e 20 L, para realização das análises microbiológicas, de acordo com os parâmetros estabelecidos pela Resolução RDC nº 275, de 22 de setembro de 2005, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)<sup>22</sup>: coliformes totais, coliformes termotolerantes<sup>23</sup>, enterococos<sup>24</sup>, clostridio sulfito redutor<sup>25</sup> e *P. aeruginosa*<sup>26</sup>, além da contagem de bactérias heterotróficas<sup>27</sup>.

Após a contaminação experimental, as amostras de água mineral de 1,5 L eram analisadas em intervalos de tempo pré-estabelecidos: 0 h, 3 h, 6 h, 24 h, 48 h, 3 dias, 5 dias, 7 dias, 9 dias, 11 dias, 22 dias, 70 dias, 100 dias, 130 dias, 160 dias, 190 dias, 220 dias, 250 dias, 280 dias, 310 dias, 340 dias e 370 dias. As amostras em galões de 20 L

eram analisadas nos seguintes intervalos de tempo: 0 h, 7 dias, 15 dias, 25 dias, 40 dias e 60 dias.

Alíquotas retiradas de cada amostra eram submetidas à contagem de bactérias heterotróficas. Após a contagem das placas, cinco colônias eram isoladas em ágar IAL (Instituto Adolfo Lutz)<sup>28</sup> e incubadas a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  por 24 h. As colônias características de *P. aeruginosa* eram isoladas em tubos contendo ágar nutriente e incubadas a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  por 24 h para serem submetidas às seguintes provas bioquímicas confirmatórias: citrato de Simmons, produção do pigmento pocianina e oxidase.

### Microscopia Eletrônica de Varredura

A microscopia eletrônica de varredura foi realizada no Laboratório de Filmes Finos do Instituto de Física da Universidade de São Paulo. Após o período de experimentação foram realizados recortes, de aproximadamente 3 x 4 mm, das garrafas de 1,5 L e dos galões de 20 L e esses fixados em suportes metálicos (*stubs*) e posteriormente secos em ambiente com sílica-gel. Com o equipamento de *Sputtering*, *Sputter SCD 004*, foi realizado um revestimento com carbono e posteriormente com ouro. As amostras foram analisadas e fotografadas em Microscópio Eletrônico de Varredura SEM JEOL JSM - 6460LV.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

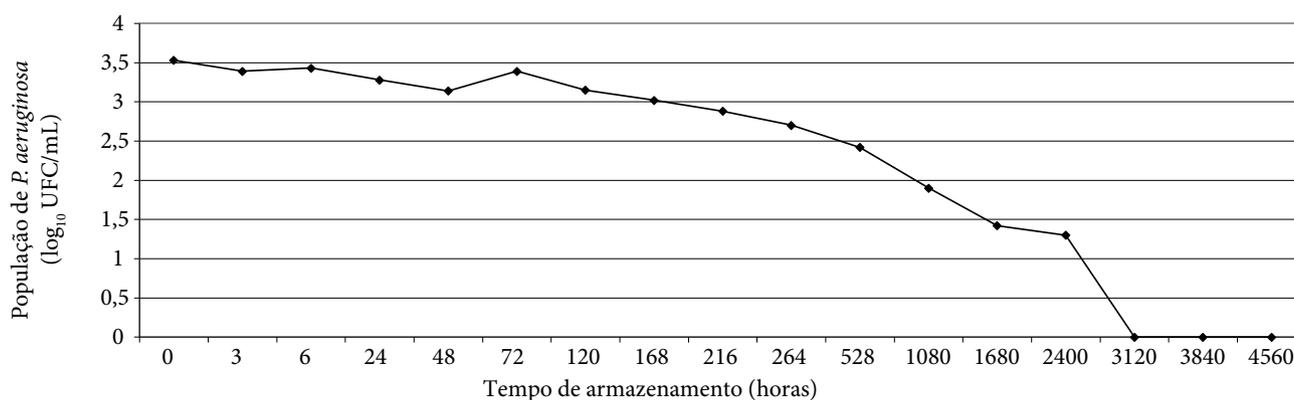
As amostras de água mineral não contaminadas experimentalmente (controle) estavam em conformidade com a Resolução RDC nº 275/2005<sup>22</sup> (coliformes totais  $<1$  UFC/mL, coliformes termotolerantes  $<1$  UFC/mL, enterococos  $<1$  UFC/mL, clostridio sulfito redutor  $<1$  UFC/mL e *P. aeruginosa*  $<1$  UFC/mL) e não apresentavam bactérias heterotróficas ( $<1$  UFC/mL).

O armazenamento da água mineral no comércio e nos pontos de consumo é realizado, geralmente, em temperatura ambiente. No Brasil, como o clima é tropical e variável nas diferentes regiões, podendo apresentar temperaturas acima de  $30^\circ\text{C}$ , optou-se por submeter às amostras a incubação nas temperaturas de  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  e de  $20$  a  $25^\circ\text{C}$ . Além disso, pela possibilidade da água mineral de 1,5 L ser armazenada e comercializada sob refrigeração, realizou-se o experimento a  $4 \pm 2^\circ\text{C}$ .

Os resultados do presente estudo mostram que a temperatura de armazenamento do produto é um fator relevante para a sobrevivência e multiplicação de *P. aeruginosa*.

A população inicial de *P. aeruginosa* foi de  $3,5 \log_{10}$  UFC/mL, no tempo 0 h após contaminação experimental, nas amostras de água mineral em garrafas de 1,5 L armazenadas a  $4 \pm 2^\circ\text{C}$ . Nestas amostras, até o 3º dia (72 horas) de armazenamento, não houve alteração significativa da população que

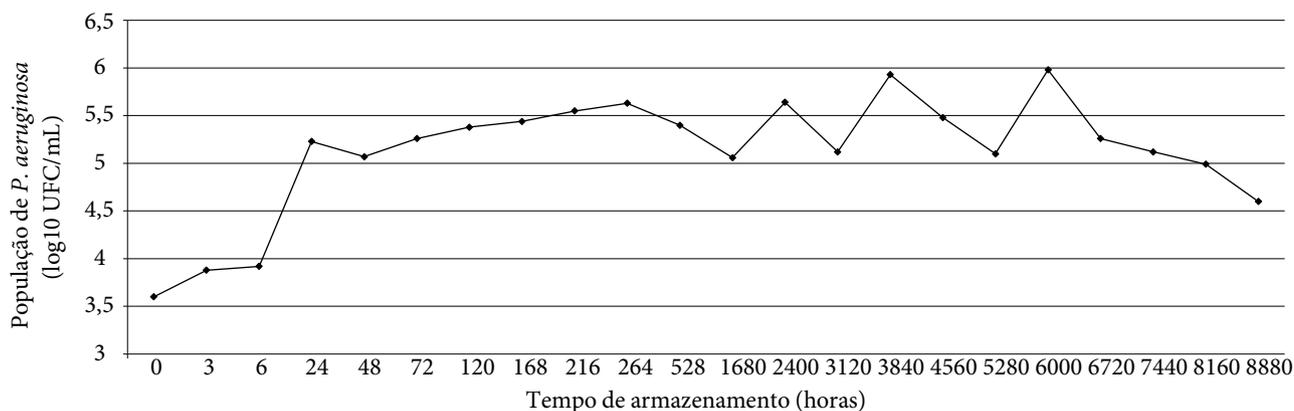
variou de 3,4 a  $3,6 \log_{10}$  UFC/mL. A partir do 3º dia de incubação houve o declínio da população de *P. aeruginosa*, com redução acentuada entre o 3º e 22º dia (528 horas) de armazenamento. Entretanto, observou-se que o micro-organismo, mesmo estando sob condições desfavoráveis para o seu desenvolvimento, se manteve viável pelo período de 100 dias (2400 horas) (Figura 1). Khan et al<sup>29</sup> demonstraram que *P. aeruginosa* pode sobreviver em água destilada por até seis meses a  $4^\circ\text{C}$ .



**Figura 1.** Perfil de desenvolvimento de *P. aeruginosa* em amostras de água mineral de 1,5 L armazenadas em temperatura de  $4 \pm 2^\circ\text{C}$  por 190 dias (4560 h)

Em relação às amostras de água mineral em garrafas de 1,5 L, armazenadas a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$ , a população inicial de *P. aeruginosa* foi de  $3,6 \log_{10}$  UFC/mL. Nas primeiras 24 h de armazenamento houve um aumento da população ( $5,2 \log_{10}$  UFC/mL) que atingiu a concentração microbiana máxima em 160 dias (3840 h)

( $5,9 \log_{10}$  UFC/mL). Após este período, iniciou-se a redução da população bacteriana que atingiu  $4,6 \log_{10}$  UFC/mL em um ano de armazenamento (Figura 2). Resultados similares foram observados por Legnani et al<sup>15</sup> que detectaram população de *P. aeruginosa* de  $4,46 \log_{10}$  UFC/mL pelo mesmo período de tempo.



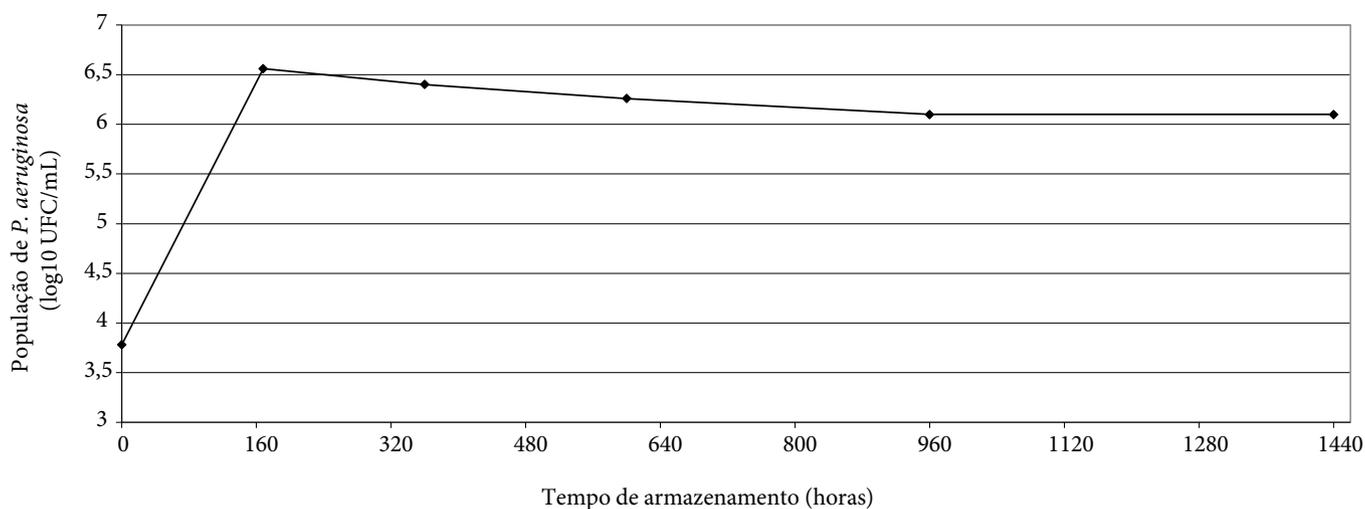
**Figura 2.** Perfil de desenvolvimento de *P. aeruginosa* em amostras de água mineral de 1,5 L armazenadas em temperatura de  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  por 370 dias (8880 h)

Nas amostras de água mineral de 20 L, mantidas a 20-25°C por 60 dias (1440 horas), verificou-se a multiplicação do micro-organismo nos primeiros dias de armazenamento. A população inicial de *P. aeruginosa* era de 3,8 log<sub>10</sub> UFC/mL e, nos sete primeiros dias de incubação, aumentou para 6,6 log<sub>10</sub> UFC/mL. A partir do 40º dia (960 horas), a população se manteve estável (6,1 log<sub>10</sub> UFC/mL) até o término do ensaio no 60º dia (Figura 3). Resultado similar foi relatado por Leclerc e Moreau<sup>30</sup> em que a população bacteriana máxima em amostras de água mineral foi observada, geralmente, quando estocadas à temperatura ambiente (aproximadamente 20°C). Por outro lado, em estudo realizado por Khaniki et al<sup>21</sup>, o maior aumento da população de *P. aeruginosa* foi verificado em amostras incubadas a 37°C.

Lewenza et al<sup>31</sup> demonstraram que *P. aeruginosa* pode sobreviver por longos períodos

na água sem nutrientes por se adaptar a este ambiente, reduzindo seu metabolismo, alterando a permeabilidade e composição da membrana, diminuindo tamanho da célula e condensando seu DNA.

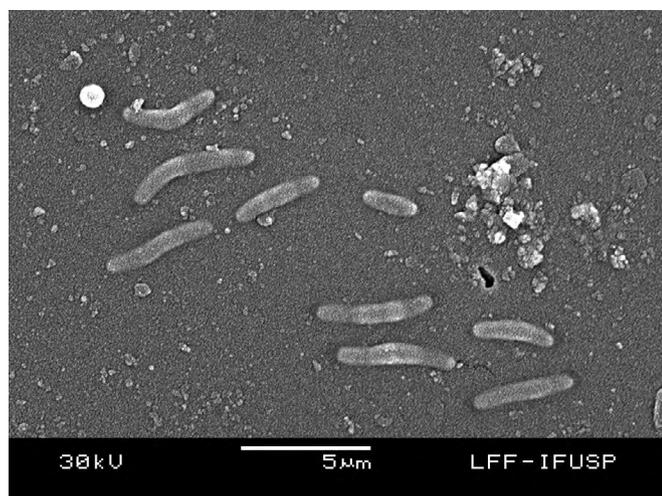
Deve-se ressaltar que as amostras utilizadas nos experimentos não apresentaram micro-organismos mesófilos, o que pode ter facilitado o desenvolvimento e sobrevivência de *P. aeruginosa* nas águas minerais. Tamagnini e Gonzáles<sup>32</sup> isolaram *P. aeruginosa* de águas minerais em garrafas plásticas, estocadas por 30 dias e observaram que quando a microbiota natural não era encontrada havia uma elevada multiplicação da bactéria. Os autores verificaram que o tempo de geração do micro-organismo era de 26,1 h nas amostras apresentando microbiota competidora e de 3,6 h na ausência de outras bactérias.



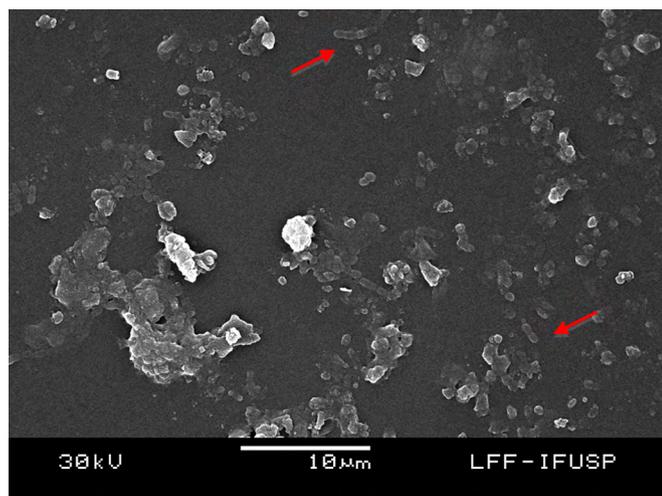
**Figura 3.** Perfil de desenvolvimento de *P. aeruginosa* em amostras de água mineral de 20 L armazenadas em temperatura de 20 a 25 °C por 60 dias (1440 h)

A contaminação da água mineral por *P. aeruginosa* pode ocorrer na fonte ou devido a falhas de higienização e sanitização dos equipamentos na linha de produção ou das embalagens retornáveis, e em função da presença de cápsula polissacarídica, este micro-organismo pode formar biofilmes em diferentes superfícies. A presença de *P. aeruginosa* aderida a superfície

de embalagens de 20 L e 1,5 L pode ser observada nas microfotografias realizadas em microscópio de varredura eletrônica (Figuras 4 e 5). Deve-se ressaltar que os fragmentos obtidos das garrafas de 1,5 L foram da parte inferior (fundo) e superior e, dos galões de 20 L foram retirados da parte central, em que havia uma reentrância na embalagem.



**Figura 4.** Microscopia eletrônica de varredura (aumento 5.000X) do fragmento de policloreto de vinila (PVC) extraído de um galão de 20 L de água mineral, onde se observa a adesão de *P. aeruginosa*



**Figura 5.** Microscopia eletrônica de varredura (aumento 2.500X) do fragmento de polietileno tereftalato (PET) de uma garrafa de 1,5 L de água mineral, onde se observa a adesão de *P. aeruginosa*

Pelo fato da *P. aeruginosa* ser um patógeno oportunista, formar biofilme e sobreviver, por um longo período, em condições adversas, sua presença em águas minerais pode representar um risco à saúde pública, podendo causar várias infecções, especialmente em imunodeprimidos. Medidas de higiene e estocagem adequadas das embalagens são fundamentais para garantir a qualidade e inocuidade do produto. Além disso, os fabricantes precisam estar atentos ao prazo de validade existente para galões de 10 e 20 L<sup>33,34</sup>, evitando assim a utilização de embalagens que possam ter ranhuras na parte interna, facilitando a formação de biofilmes<sup>35</sup>.

## CONCLUSÃO

Os resultados demonstraram que o armazenamento da água mineral sob refrigeração (4°C) contribui para a redução da população de *P. aeruginosa*, enquanto temperaturas mais elevadas favorecem a multiplicação do micro-organismo e sua sobrevivência por longos períodos. Nas amostras armazenadas a 35 ± 1°C *P. aeruginosa* se manteve viável por mais de um ano, demonstrando a capacidade de adaptação dessa bactéria em ambientes com baixas concentrações de nutrientes. Os galões de água mineral de 20 L merecem atenção especial, pois além de serem retornáveis, são armazenados, geralmente, em temperatura ambiente que pode favorecer o aumento da população de *P. aeruginosa*, como demonstrado nesse estudo. Portanto, as Boas Práticas de Fabricação (BPF) e a aplicação do sistema APPCC (Análise de Perigo e Pontos Críticos de Controle) devem ser implantadas e implementadas pela indústria de águas minerais para minimizar estes riscos.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem Daniel C. Flores (Departamento de Epidemiologia – Faculdade de Saúde Pública, Universidade São Paulo) pela colaboração na Microscopia Eletrônica de Varredura.

## REFERÊNCIAS

1. Pant ND, Poudyal N, Bhattacharya SK. Bacteriological quality of bottled drinking water versus municipal tap water in Dharan municipality, Nepal. *J Health Popul Nutr*. 2016;35(1):17. <https://doi.org/10.1186/s41043-016-0054-0>
2. Associação Brasileira da Indústria de Águas Minerais - ABINAM. [acesso 2017 Mar 28]. Disponível em: [http://www.abinam.com.br/lermais\\_materias.php?cd\\_materias=71](http://www.abinam.com.br/lermais_materias.php?cd_materias=71)
3. Mohammadi Kouchesfahani M, Alimohammadi M, Nabizadeh Nodehi R, Aslani H, Rezaie S, Asadian S. *Pseudomonas aeruginosa* and heterotrophic bacteria count in bottled waters in Iran. *Iran J Public Health*. 2015;44(11):1514-9.

- Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4703231/pdf/IJPH-44-1514.pdf>
- Gonzalez C, Gutierrez C, Grande T. Bacterial flora in bottled uncarbonated mineral drinking water. *Can J Microbiol*. 1987;33(12):1120-5. <https://dx.doi.org/10.1139/m87-196>
  - Eiroa MNU, Junqueira VCA, Silveira NFA. 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. *Ciênc Tecnol Aliment*.1997;17(2):167-71. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20611997000200019>
  - Eiroa MNU, Junqueira VCA, Silveira NFA. Avaliação microbiológica de linhas de captação e engarrafamento de água mineral. *Ciênc Tecnol Aliment*.1996;16(2):165-9.
  - Abd El-Salam MM, Al-Ghitany EM, Kassem MM. Quality of bottled water brands in Egypt Part II: biological water examination. *J Egypt Public Health Assoc*. 2008;83(5-6):468-86.
  - Faruche Filho A, Dias MFF, Taromaru PH, Cerqueira CS, Duque JG. Qualidade microbiológica de águas minerais não carbonatadas em embalagens de 1,5 litros, comercializadas em Araraquara-SP. *Alim Nutr Araraquara*. 2009;19(4):421-5.
  - Coelho MIS, Mendes ES, Cruz MCS, Bezerra SS, Silva RPP. 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. <https://doi.org/10.4025/actascihealthsci.v32i1.3837>
  - Naze F, Jouen E, Randriamahazo RT, Simac C, Laurent P, Blériot A et al. *Pseudomonas aeruginosa* outbreak linked to mineral water bottles in a Neonatal intensive care unit: fast typing by use of high-resolution melting analysis of a variable-number tandem-repeat locus. *J Clin Microbiol*. 2010;48(9):3146-52. <https://doi.org/10.1128/JCM.00402-10>
  - Casanovas-Massana A, Blanch AR. Diversity of the heterotrophic microbial populations for distinguishing natural mineral waters. *Int J Food Microbiol*. 2012;153(1-2):38-44. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.10.012>
  - Pedrosa AP, Brandão MLL, Medeiros VM, Rosas CO, Bricio SML, Almeida AECC. Pesquisa de fatores de virulência em *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de águas minerais naturais. *Rev Ambient Água*. 2014;9(2):313-24. <http://dx.doi.org/10.4136/ambi-agua.1359>
  - Tafere W, Abera F, Beyene Y, Legesse T. Microbiological quality and safety of bottled water brands sold in Ethiopia. *Ethiop J Health Dev*. 2014;28(3):178-84. Disponível em: <https://www.ejhd.org/index.php/ejhd/article/view/24/pdf>
  - Georgieva V, Dimitrova Y. Study of the microbiological quality of bulgarian bottled water in terms of its contamination with *Pseudomonas aeruginosa*. *Cent Eur J Public Health*. 2016; 24(4):326-30. <https://doi.org/10.21101/cejph.a4219>
  - Legnani P, Leoni E, Rapuano S, Turin D, Valenti C. Survival and growth of *Pseudomonas aeruginosa* in natural mineral water: a 5-year study. *Int J Food Microbiol*. 1999;53(2-3):153-8. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(99\)00151-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(99)00151-8)
  - Caskey S, Stirling J, Moore JE, Rendall JC. Occurrence of *Pseudomonas aeruginosa* in waters: implications for patients with cystic fibrosis (CF). *Lett Appl Microbiol*. 2018;66(6):537-41. <https://doi.org/10.1111/lam.12876>
  - Falcone-Dias MF, Vaz-Moreira I, Manaia CM. Bottled mineral water as a potential source of antibiotic resistant bacteria. *Water Res*. 2012;46(11):3612-22. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.04.007>
  - Kim YJ, Jun YH, Kim YR, Park KG, Park YJ, Kang JY et al. Risk factors for mortality in patients with *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia; retrospective study of impact of combination antimicrobial therapy. *BMC Infect Dis*. 2014;14:161. <https://dx.doi.org/10.1186/1471-2334-14-161>
  - Mena KD, Gerba CP. Risk assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in water. *Rev Environ Contam Toxicol* 2009;201:71-115. [https://dx.doi.org/10.1007/978-1-4419-0032-6\\_3](https://dx.doi.org/10.1007/978-1-4419-0032-6_3)
  - Sharma G, Rao S, Bansal A, Dang S, Gupta S, Gabrani R. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: potential therapeutic targets. *Biologicals*, 2014;42(1):1-7. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2013.11.001>

21. Khaniki GRJ, Aghaee EM, Alimohammadi M, Dehghani MH. Effects of Environmental Conditions on Growth and Permanence of *Pseudomonas aeruginosa* in Bottled Water. *J Appl Biol Sci*. 2014;8(2):91-5. <http://www.jabsonline.org/index.php/jabs/article/view/378/381>
22. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº. 275, de 22 set. 2005. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Água Mineral Natural e Água Natural. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 24 mai. 2007. Disponível em: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2005/rdc0275\\_22\\_09\\_2005.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2005/rdc0275_22_09_2005.html)
23. Hall N.H. 9222 B Standard total coliform membrane filter procedure using endo media. 9222 G Partitioning thermotolerant coliforms from MF total coliform using EC broth. *In*: Baird RB, Eaton AD, Rice EW et al. Standard methods for the examination of water and wastewater. 23. ed. Washington (DC): APHA, AWWA, WEF; 2017.
24. Noble T R. 9230 C Membrana filter techniques. *In*: Baird RB, Eaton AD, Rice EW et al. Standard methods for the examination of water and wastewater. 23. ed. Washington (DC): APHA, AWWA, WEF; 2017.
25. International Organization for Standardization – ISO. ISO 14189. Water quality – Enumeration of *Clostridium perfringens* – Method using membrane filtration. 1. ed., 2013.
26. Oshiro R. K., Fujioka R. S., Oliver J., Shields J. M. 9213 E Membrana filter technique for *Pseudomonas aeruginosa*. *In*: Baird RB, Eaton AD, Rice EW et al. Standard methods for the examination of water and wastewater. 23. ed. Washington (DC): APHA, AWWA, WEF; 2017.
27. Dicheter G., LeChevallier M. W. 9215 B Pour plate method. *In*: Baird RB, Eaton AD, Rice EW et al. Standard methods for the examination of water and wastewater. 23. ed. Washington (DC): APHA, AWWA, WEF; 2017.
28. Pessôa GV, Da Silva EA. Milieu pour l'identification présomptive rapide dès entérobactéries, dès *Aeromonas* et dès vibrions. *Ann Microbiol (Paris)* 1974;125A(3):341-7.
29. Khan NH, Ahsan M, Taylor WD, Kogure K. Culturability and survival of marine, freshwater and clinical *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbes Environ*. 2010;25(4):266-74. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME09178>
30. Leclerc H, Moreau A. Microbiological safety of natural mineral water. *FEMS Microbiology Reviews* 2002; 26:207-222. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2002.tb00611.x>
31. Lewenza S, Abboud J, Poon K, Kobryn M, Humplik I, Bell JR et al. *Pseudomonas aeruginosa* displays a dormancy phenotype during long-term survival in water. *PLoS One*. 2018;13(9):e0198384. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198384>
32. Tamagnini LM, González RD. Bacteriological stability and growth kinetics of *Pseudomonas aeruginosa* in bottled water. *J Appl Microbiol*. 1997;83(1):91-4. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1997.d01-400.x>
33. Ministério de Minas e Energia (BR). Departamento Nacional de Produção Mineral (DNPM). Portaria nº 387, de 19 de setembro de 2008. Disciplina o uso das embalagens plástico-garração retornável, destinadas ao envasamento e comercialização de água mineral e potável de mesa e dá outras providências. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 23 set 2008. Disponível em: [https://anmlegis.datalegis.inf.br/action/UrlPublicasAction.php?acao=abrirAtoPublico&num\\_ato=00000387&sgl\\_tipo=POR&sgl\\_orgao=DNPM/MME&vlr\\_ano=2008&seq\\_ato=000](https://anmlegis.datalegis.inf.br/action/UrlPublicasAction.php?acao=abrirAtoPublico&num_ato=00000387&sgl_tipo=POR&sgl_orgao=DNPM/MME&vlr_ano=2008&seq_ato=000)
34. Ministério de Minas e Energia (BR). Departamento Nacional de Produção Mineral. Portaria 358, de 21 de setembro de 2009. Altera a Portaria 387, de 19 de setembro de 2008. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 22 set 2009. Disponível em: [https://anmlegis.datalegis.inf.br/action/UrlPublicasAction.php?acao=abrirAtoPublico&num\\_ato=00000358&sgl\\_tipo=POR&sgl\\_orgao=DNPM/MME&vlr\\_ano=2009&seq\\_ato=000](https://anmlegis.datalegis.inf.br/action/UrlPublicasAction.php?acao=abrirAtoPublico&num_ato=00000358&sgl_tipo=POR&sgl_orgao=DNPM/MME&vlr_ano=2009&seq_ato=000)
35. Jones CR, Adams MR, Zhdan PA, Chamberlain AH. The role of surface physicochemical properties in determining the distribution of the autochthonous microflora in mineral water bottles. *J Appl Microbiol*. 1999;86(6):917-27. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00768.x>