

DÉBORA LEAL COELHO

**USO DO MÉTODO DO SUBSTRATO CROMOGÊNICO PARA
QUANTIFICAÇÃO DO NÚMERO MAIS PROVÁVEL (N.M.P.) DE BACTÉRIAS
DO GRUPO COLIFORME EM ÁGUAS MINERAIS ENVASADAS**

Monografia apresentada à
Coordenação do Curso de Ciências
Biológicas como parte das
exigências para conclusão do
Bacharelado em Ciências Biológicas
na área de Microbiologia - Estágio
em Patologia Básica.

Orientadoras: Ida Chapaval Pimentel
Márcia Regina Beux

Curitiba
1997

*Ao meu esposo Alessandro
pelo apoio e dedicação*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A todas as pessoas que tornaram possível a realização deste trabalho. Em especial a professora Ida Chapaval Pimentel, do Departamento de Patologia Básica da Universidade Federal do Paraná, por sua orientação, a Bióloga Márcia Regina Beux, Coordenadora do Laboratório de Microbiologia de Águas do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos (CEPPA), que coordenou o desenvolvimento desta pesquisa, ao professor Gabriel Adolfo Guimarães, Engenheiro Químico - Diretor Executivo - CEPPA, por ter cedido o local e o material para realização deste trabalho, a Anelise, Vanusa, Noêmia e Katia, do Laboratório de Microbiologia - CEPPA, pelo companheirismo.

SUMÁRIO

RESUMO	i
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	02
2.1. BACTÉRIAS ENCONTRADAS NAS ÁGUAS	02
2.2. ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS DE ÁGUAS MINERAIS	03
2.2.1. Microflora indígena ou autóctone	03
2.2.2. Microrganismos contaminantes.....	04
2.3. A NECESSIDADE DA ÁGUA	04
2.4. ÁGUA MINERAL.....	05
2.5. PREFERÊNCIA DOS CONSUMIDORES PELA ÁGUA MINERAL.....	05
2.6. DEFINIÇÃO DO GRUPO COLIFORME PARA O SUBSTRATO CROMOGÊNICO.....	06
2.6.1. Coliformes totais.....	06
2.6.2. Coliformes fecais	06
3. MATERIAIS E MÉTODOS	08
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
4.1. COLIFORMES DETECTADOS NAS CARTELAS PLÁSTICAS ATRAVÉS DO MÉTODO DO SUBSTRATO CROMOGÊNICO	14
4.2. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS PRESENTES NAS CAVIDADES POSITIVAS.....	17
4.2.1. Verde brilhante lactose bile a 2%	17
4.2.2. Ágar eosina azul de metileno (EMB) segundo Levine	18
5. CONCLUSÃO	22
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23

RESUMO

O presente trabalho avaliou a qualidade microbiológica da água mineral envasada disponível para venda ao mercado consumidor de Curitiba, quanto ao índice de contaminação por coliformes fecais (*Escherichia coli*) e totais. Para as análises utilizou-se um dos métodos mais recentes, o substrato cromogênico, conforme descrito no Standard Methods of the Examination of Water and Wastewater (APHA, 1995).

As marcas submetidas ao método foram codificadas com as letras **A**, **B**, **C**, **D**, **E** e **F**. Dessas seis amostras a **A** e **B** foram as que apresentaram resultado positivo para coliformes totais. Após a prova bioquímica constatou-se a presença dos coliformes *Enterobacter gergoviae* e *E. aerogenes* na **B**; e na **A** foram detectados os coliformes *E. gergoviae*, *Citrobacter freundii* e um microrganismo não coliforme, gram negativo não fermentador da glicose.

A presença de coliformes na água mineral pode indicar a falta de cuidados sanitários bem como problemas nas operações de captação, decantação, canalização, elevação mecânica, provisão em reservatórios, filtração, envasamento, carbonatação ou outros que possam alterar as propriedades características e a composição das mesmas.

1. INTRODUÇÃO

O consumo de água mineral envasada tornou-se popular somente na última década. Esse aumento é devido a constante preocupação da população com a saúde, decorrente da poluição progressiva das águas.

A água é um substrato para bactérias, por isso é importante dispor de critérios ou padrões microbiológicos numericamente estabelecidos tomando em consideração os valores máximos aceitáveis, para não colocar em risco a saúde dos consumidores e também garantindo a boa qualidade da água proveniente de fontes naturais ou artificialmente captadas, que são envasadas e comercializadas.

Neste trabalho foram analisados os parâmetros estabelecidos pela legislação em vigor (Resolução 25/76), que considera apenas a espécie *Escherichia coli* como indicadora microbiológica de contaminação.

Para enumeração do grupo coliforme são preconizados três métodos segundo Standard Methods of the Examination of Water and Wastewater (APHA, 1995). Desses métodos, dois quantificam os coliformes através do uso de tubos múltiplos que revelam a densidade bacteriana expressa pelo número mais provável (N.M.P.), o método padrão e o substrato cromogênico. O terceiro permite a visualização do número de colônias de microrganismos existentes, expressando o resultado em U.F.C. (Unidade Formadora de Colônia).

Utilizando-se do método mais recente, substrato cromogênico, o presente trabalho analisou seis marcas de água mineral de um litro envasadas disponíveis no mercado. Tendo como objetivo avaliar o índice de contaminação por coliformes fecais (*E. coli*) e totais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. BACTÉRIAS ENCONTRADAS NAS ÁGUAS

Vários tipos de bactérias patogênicas podem ser encontradas na água. Os problemas tradicionalmente associados à falta de cuidados sanitários são a salmonelose e a cólera, causadas respectivamente por espécies do gênero *Salmonella* e *Vibrio cholerae*. Os indivíduos acometidos destas enfermidades excretam os respectivos agentes etiológicos nas fezes. A espécie *Escherichia coli*, parte da microbiota intestinal normal do homem, está sempre presente nas fezes sem causar nenhum sintoma, não obstante existam alguns sorotipos enteropatogênicos especialmente para crianças pequenas. As cepas de *Escherichia coli* enteropatogênicas correspondem a menos de 1% da população dessa espécie presente em água poluída. O gênero *Shigella* inclui bactérias patogênicas semelhantes a *Escherichia* e *Salmonella* e também podem ser encontradas em água poluída com esgoto doméstico. Outro patógeno encontrado em águas tropicais brasileiras, é a *Yersinia enterocolitica*; apesar de ser uma espécie adaptada a baixas temperaturas. A espécie anaeróbica esporulada *Clostridium perfringens* sobrevive em águas poluídas com resíduos tóxicos que inibem o crescimento de outras espécies da microbiota. Esta espécie pode provocar enterites e gangrena gasosa. A *Leptospira* entra na água com a urina de animais selvagens e domésticos infectados. Pode ocasionar problemas de hepatite, conjuntivite e insuficiência renal. Também espécies de *Mycobacterium*, em que estão incluídas espécies responsáveis pela tuberculose, podem contaminar banhistas através da aspiração da água. Algumas bactérias patogênicas fazem parte da microbiota normal da água, como por exemplo, *Vibrio parahaemolyticus*, espécie marinha que quando ingerida com pescado cru ou cozido pode provocar gastroenterite. Outro exemplo é *Aeromonas hydrophyla*, habitante comum de águas de superfície doce e salgada, e que podem provocar enfermidades. (LEITÃO, 1988)

Também merecem atenção as bactérias capazes de induzir infecções externas no corpo, quando o risco decorre do simples contato com a água contaminada, mesmo sem ingestão. Dois exemplos comuns são *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* (LEITÃO, 1988).

2.2. ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS DE ÁGUAS MINERAIS

2.2.1. Microbiota indígena ou autóctone

Águas minerais naturais não são estéreis, possuem microrganismos que são próprios dela, existentes antes de qualquer tratamento ou processamento.

As bactérias autóctones são caracterizadas fisiologicamente por seu requerimento baixo em N_2 , por necessitarem somente de pequenas quantidades de compostos orgânicos para seu crescimento e por serem, usualmente, aeróbicas e psicotróficas.

Embora, a microbiota autóctone permaneça num nível baixo em população enquanto a água está em seu ambiente natural, as bactérias começam a crescer rapidamente logo após o engarrafamento. Encontram-se maiores microbiotas em águas de garrafas plásticas e acredita-se ser devido à característica de que o plástico permite a passagem de O_2 proporcionando uma superfície de crescimento adequada para as bactérias. O melhor crescimento de espécies indígenas tem sido descrito em águas com conteúdo mineral maior e geralmente estas espécies não crescem a $37^\circ C$, crescendo melhor à temperatura abaixo de $20^\circ C$.

O significado, para a Saúde Pública, das bactérias indígenas tem sido discutido, pois alguns autores têm indicado que estas bactérias são incapazes de colonizar o trato digestivo possivelmente devido à sua inabilidade em sobreviver em potencial redox baixo e à temperatura de $37^\circ C$ deste ambiente. Conseqüentemente, estas bactérias são consideradas sem perigo à saúde pública. Entretanto, algum interesse tem sido expressado sobre a habilidade

destas bactérias em converter o nitrato das águas minerais em nitrito (VIEIRA, 1989).

2.2.2. Microrganismos contaminantes

Um segundo tipo de flora bacteriana que pode surgir, não sendo proveniente da fonte são as chamadas bactérias alóctones, que aparecem durante as etapas prévias ao engarrafamento, durante o processamento ou mesmo do ambiente.

Um crescimento significativo destas bactérias é raro, principalmente devido a seus requerimentos nutricionais. Os tipos mais persistentes de bactérias alóctones possuem características fisiológicas semelhantes às espécies autóctones. Estas incluem um número de espécies mesófilas gram negativas, tais como: *Pseudomonas cepacia*, *Pseudomonas multivorans*, *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas aeruginosa*.

As espécies patogênicas de interesse primário em águas minerais são: *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi*, *Vibrio cholerae*, *Shigella sp*, *Pseudomonas cepacia*, vírus entéricos e alguns protozoários. Estes organismos chegam até a água por contaminação fecal ou outras vias, seja até a fonte ou durante o engarrafamento. As características de crescimento e sobrevivência deste organismos nas águas minerais requerem mais estudos.

2.3. A NECESSIDADE DA ÁGUA

A água é muito utilizada por todos, no entanto é difícil perceber o quão importante ela é para existência. A pressão do crescimento populacional e a ascensão do padrão de vida, estão, contudo, forçando a população a prestar o devido respeito com a água como principal recurso natural digno de estudo e conservação. Ainda que um recurso renovável, agora, a água é vista como um limite finito para o suprimento de água utilizável e isto irá limitar a população mundial.

O homem precisa de água para uma larga variedade de usos, os quais são classificados em seis categorias: uso doméstico, agricultura, para fins industriais, para gerar energia, remoção de resíduos e para transporte e recreação (BALCHIN, 1984).

2.4. ÁGUA MINERAL

Águas minerais são águas de origem profunda não sujeitas à influência de águas superficiais, provenientes de fontes naturais ou de fontes artificialmente captadas, que possuem composição química ou propriedades físicas ou físico-químicas distintas das águas comuns (Resolução nº 25/76).

Tradicionalmente, as águas minerais eram aquelas que emergiam naturalmente de uma fonte subterrânea e eram consumidas no lugar de origem. Atualmente elas são engarrafadas e vendidas em lugares distantes do seu sítio de origem. Existem também as águas minerais “artificiais” ou “manufaturadas” que são preparadas pela adição dos minerais apropriados em água potável. Conseqüentemente tem sido necessário introduzir o termo água mineral “natural” para distinguir a água de nascentes subterrâneas, de águas manufaturadas.

2.5. PREFERÊNCIA DOS CONSUMIDORES PELA ÁGUA MINERAL

Por serem provenientes de fontes naturais apresentam vários benefícios, além de serem nutricionais, medicinais e possuírem propriedades terapêuticas. As águas minerais podem ser comparadas com a água potável de consumo público em termos de higiene ou conteúdo microbiano. São aptas para preparação de alimentos infantis e dietas especiais.

O aumento do consumo está ligado também à preocupação existente hoje, pelo aumento da poluição das águas, pelos odores e sabores desagradáveis dos suplementos de águas municipais e pela objeção ao flúor, cloro e outros aditivos (VIEIRA, 1989).

2.6. DEFINIÇÃO DO GRUPO COLIFORME PARA O SUBSTRATO CROMOGÊNICO

2.6.1. Coliformes totais

Bactérias na forma de bastonetes, gram negativos, não formadoras de esporos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, que hidrolizam o substrato Ortonitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ONPG) transformando-o em Ortonitrofenol. O grupo inclui cerca de 20 espécies, dentre as quais encontram-se tanto bactérias originárias do trato gastrintestinal de humanos e outros animais de sangue quente, como também diversos gêneros e espécies de bactérias não entéricas, como *Serratia* e *Aeromonas*, por exemplo. Por essa razão, sua enumeração em água e alimentos é menos representativa, como indicação de contaminação fecal, do que a enumeração de coliformes fecais ou *E. coli* (SILVA & JUNQUEIRA, 1995).

Dentre as bactérias de habitat reconhecidamente fecal, a *E. coli* é a mais conhecida e a mais facilmente diferenciada dos membros não fecais, e é o melhor indicador de contaminação fecal conhecido até o momento (SILVA & JUNQUEIRA, 1995).

O método reconhece como coliformes totais as cavidades com bactérias que alteram a coloração do meio, de incolor para amarelo.

2.6.2. Coliformes fecais

Bactérias na forma de bastonetes, gram negativos, não formadoras de esporos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, que hidrolizam o substrato Ortonitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ONPG) transformando-o em Ortonitrofenol. O resultado para *E. coli* é positivo quando apresentam fluorescência azul sob luz ultravioleta (360nm), devido à ação do 4-metilumbeliferil- β -D-glucoronídeo (MUG) utilizado como substrato para

indicar a presença da enzima β -glucoronidase. Esta enzima é caracteristicamente produzida pela *E. coli* e quando o MUG é degradado pela β -glucoronidase o produto resultante 4-metilumbeliferona é fluorescente sob luz ultravioleta.

O grupo dos coliformes fecais inclui pelo menos três gêneros, *Escherichia*, *Enterobacter* e *Klebsiella*, dos quais dois (*Enterobacter* e *Klebsiella*) incluem cepas de origem não fecal. Por esse motivo, a presença de coliformes fecais em alimentos é menos representativa, como indicação de contaminação fecal, do que a enumeração direta de *E. coli*, porém, muito mais significativa do que a presença de coliformes totais, dada a alta incidência de *E. coli* dentro do grupo fecal.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram analisadas seis amostras de água mineral em garrafas plásticas de um litro, compradas no mercado da cidade de Curitiba, em duplicata (Figura 1), pelo método de contagem de coliformes totais e fecais (*Escherichia coli*) através do uso de substrato cromogênico, preconizado pelo Standard Methods of the Examination of Water and Wastewater, (APHA, 1995). Em todas as garrafas realizou-se assepsia com algodão embebido no álcool (Figura 2).

Figura 1: Seis amostras de água mineral em duplicata.



Figura 2: Assepsia das garrafas com algodão embebido no álcool.



Foi utilizado o sistema Quanti-Tray, que é composto por frascos estéreis graduados com capacidade para 100 mL, flaconetes com meio de cultura, cartelas estéreis com 97 cavidades (Figura 3) e seladora Quanti-Tray (Figura 4).

Figura 3: Cartelas estéreis com 97 cavidades, flaconetes com meio de cultura e frascos estéreis graduados com capacidade para 100mL

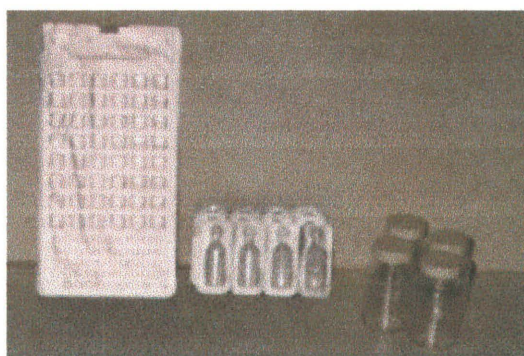


Figura 4: Seladora Quanti-Tray



O processo foi desenvolvido dentro da capela de fluxo laminar, onde cada amostra foi transferida para um frasco estéril graduado, sem diluição (Figura 5), em seguida foi adicionado, para cada frasco, um flaconete contendo a quantidade exata de meio de cultura não declarado (Figura 6). Depois que o meio de cultura dissolveu por completo a amostra foi transferida para uma

cartela plástica estéril (Figura 7) . A seladora possui um suporte de borracha onde as cartelas se encaixam (Figura 8). Após seladas as cartelas foram incubadas em estufa bacteriológica regulada a $35\pm 05^{\circ}\text{C}$ (Figura 9) por 24 horas.

Figura 5: Amostra sendo transferida para o frasco estéril com capacidade para 100mL.



Figura 6: Flaconetes com meio de cultura (não declarado) sendo adicionado na amostra.

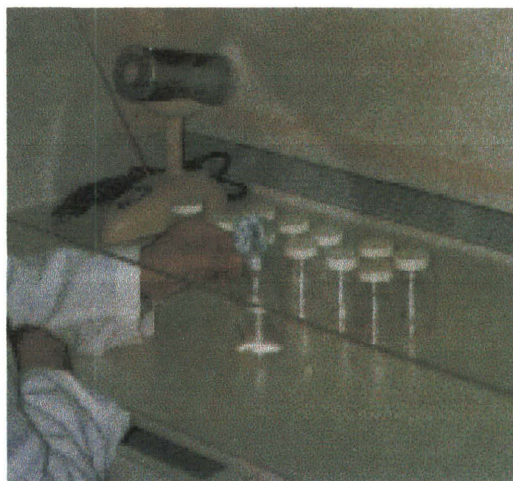


Figura 7: Amostra sendo transferida para as cartelas estéreis com 97 cavidades.

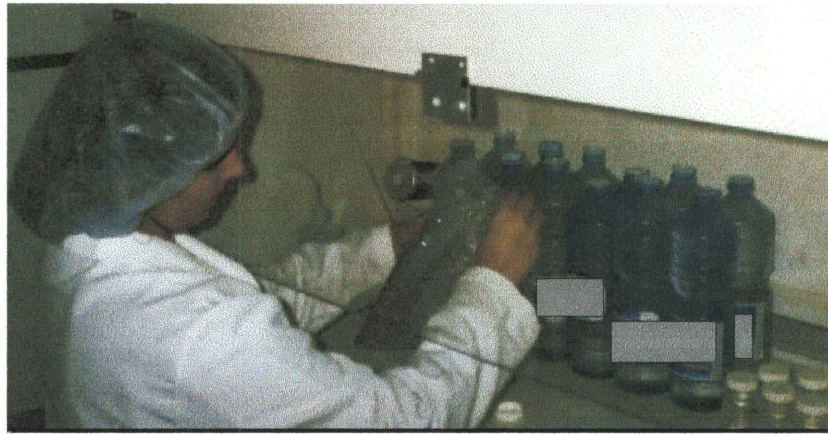


Figura 8: Cartelas estéreis sendo seladas na seladora Quanti-Tray.



Figura 9: Cartelas incubadas em estufa bacteriológica regulada a $35 \pm 0,5$ °C.



No sistema utilizado, o Quanti- Tray, os tubos múltiplos são substituídos por 97 cavidades contidas na cartela plástica estéril. O resultado de coliformes totais e fecais (*E. coli*) é obtido simultaneamente. Este método amplia, em comparação ao método padrão de fermentação em tubos múltiplos, o número de combinações positivas possíveis, fornecendo resultados mais precisos.

O método reconhece como coliformes totais, as cavidades com bactérias que hidrolizaram o substrato Orto-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ONPG) transformando-o em Orto-nitrofenol, alterando a coloração do meio, de incolor para amarelo e reconhece como coliformes fecais (*E. coli*) as cavidades com bactérias que apresentam fluorescência azul sob luz ultravioleta (360nm), devido à ação do 4-metilumbeliferil- β -D-glucoronídeo (MUG) utilizado como substrato para indicar a presença da enzima β -glucoronidase. Esta enzima é caracteristicamente produzida pela *E. coli* e quando o MUG é degradado pela β -glucoronidase o produto resultante 4-metilumbeliferona é fluorescente sob luz ultravioleta.

Os resultados são expressos através do NMP (Número Mais Provável)/100mL da amostra obtido na tabela de combinação de cavidades positivas (ANEXO).

Após a leitura, as cavidades das cartelas que apresentaram resultados positivo (Figura 10) foram transferidas, com auxílio de alças descartáveis, para tubos de verde brilhante, lactose bile a 2% (Figura 11), que é um caldo seletivo para coliformes totais (10g peptona, 10g lactose, 20g bile de boi desidratada, 0,0133g verde brilhante, 1.000mL água destilada) e para placas de ágar eosina azul de metileno segundo Levine - ágar EMB (Figura 12), seletivo para bactérias gram negativas - fermentadoras ou não da glicose - (10g peptona, 10g lactose, 2,0g hidrogenofosfato de potássio, 0,4g eosina amarela, 0,065g azul de metileno, 15,0g ágar, 1.000mL água destilada). Tanto os tubos quanto as placas foram incubados em estufa bacteriológica regulada a $35\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. Os tubos de verde brilhante foram lidos sob luz ultravioleta e as colônias que cresceram nas placas de EMB foram repicadas no ágar três açúcares e ferro - TSI (15g peptona, 5g proteose-peptona, 3,0g

extrato de carne, 3,0g extrato de levedura, 5,0g cloreto de sódio, 10g lactose, 10g sacarose, 1,0 glicose, 0,2g sulfato ferroso amônia 6.H₂O, 0,2g tiosulfato de sódio, 0,024g vermelho de fenol, 13g ágar, 1.000mL água destilada) e no ágar lisina-ferro-LIA (5,0g peptona de carne, 3,0g extrato de levedura, 1,0g glicose, 10g l-lisina monoclóridato, 0,04g tiosulfato de sódio, 0,5g citrato férrico amoniacal, 0,02g púrpura de bromocresol, 15g ágar, 1000mL água destilada) (Figura 13), que serviram para isolamento das colônias.

Para identificação das colônias repicadas do EMB para os meios TSI e LIA, foi utilizado o mini kit da Newprov para enterobactérias que é composto pelas seguintes provas: desaminação do L triptofano, descarboxilação da lisina, descarboxilação da ornitina e indol, leitura de citrato, fermentação da rhamnose. O mini-kit não apresenta prova de fermentação da lactose, por isso tem de ser complementado.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. COLIFORMES DETECTADOS NAS CARTELAS PLÁSTICAS ATRAVÉS DO MÉTODO DO SUBSTRATO CROMOGÊNICO

O resultado é positivo para coliformes totais quando as cavidades alteram a coloração de incolor para amarelo e para coliformes fecais (*E. coli*) as cavidades com bactérias que apresentam fluorescência azul sob luz ultravioleta (360nm) (conforme descrito no item 3). As marcas que apresentaram coloração amarelo foram a **A** e a **B** (Figura 10), sendo 3 cavidades positivas para **A** e 2 para **B**, indicando a presença de coliformes totais, no entanto essas cavidades não apresentaram fluorescência azul sob luz ultravioleta, o que indica ausência de *E. coli* nas amostras. Com o número de cavidades positivas obteve-se o número mais provável de densidade bacteriana de acordo com a tabela em anexo, onde em uma coluna está representado o número de cavidades grandes e na outra coluna o número de cavidades pequenas que foram positivas. Como na marca **A** o número de cavidades grandes positivas (amarela) foi três e o número de pequenas foi zero, o resultado encontrado na tabela do Número Mais Provável (anexo) foi de 3,1 NMP/100mL da amostra. Por ser um valor aproximado possui um limite de confiança, onde o mínimo é de 0,69 e o máximo de 8,90. A marca **B** apresentou duas cavidades grandes positivas (amarelas) e nenhuma pequena, logo o resultado encontrado na tabela foi de 2,0 NMP /100mL da amostra, onde o limite de confiança é de 0,26 a 7,10 (Tabela 1).

Figura 10: Cartelas plásticas estéreis com resultados positivos para coliformes totais, representados pela alteração de incolor para amarelo.

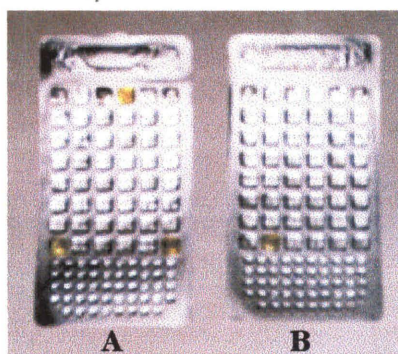


Tabela 1: Número mais provável da densidade bacteriana nas cartelas plásticas da marca **A** e **B**, em 100mL da amostra.

NMP 100mL Marca	Coliformes Totais	Coliformes Fecais	Limite de Confiança
A	3,1	0	0,69 → 8,90
B	2,0	0	0,26 → 7,10

Para a Legislação vigente no Brasil (Resolução 25/76) essas amostras estariam aprovadas, pois a única especificação da lei é a ausência de *Escherichia coli* em 100mL da amostra. Contudo existem outras especificações propostas para águas minerais naturais engarrafadas.

As especificações do Codex Alimentarius Commission (1984) (Tabela 2) incluem como primeiro exame coliformes fecais (*E. coli*), *Streptococcus-D*, *Pseudomonas aeruginosa*, o segundo exame, incluindo as mesmas análises, será necessário caso o número de *Streptococcus* seja maior ou igual a um ou menor ou igual a dois.

O Codex não inclui critérios para contagem total em placas, de aeróbios. Isto reconhece o fato que águas minerais naturais engarrafadas possuem uma microbiota indígena (item 2.2.1.) inofensiva que crescem à populações tão altas quanto 10^6 cél/mL durante a comercialização. Entretanto o código inclui especificações para a contagem total de aeróbios da água, na nascente, e isto depende de um conhecimento da ecologia microbiana de cada fonte de água em particular.

Tabela 2: Especificações microbiológicas propostas para engarrafamento de águas minerais naturais não carbonatadas (Codex Alimentarius Commission, 1984)

1º EXAME				
Organismo/grupo	Amostra	Decisão		
Coliformes	1 x 250mL	aceito se ausente		
Estreptococos-D	1 x 250mL	se ≥ 1 ou ≤ 2 - fazer 2º exame		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1 x 250mL	aceito se ausente / rejeito se ≥ 1		
2º EXAME				
Organismo/grupo	n	C	m	M
Coliformes	4 x 250mL	1	0	2
Estreptococos-D	4 x 250mL	1	0	2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4 x 250mL	0	0	0

n= número de amostras submetidas a exame

C= número de unidades defeituosas tolerado entre as unidades de amostras coletadas

m= valor de contagem mínima

M= valor de contagem máxima

Na tabela 3 pode-se verificar as especificações propostas pela Comunidade Econômica Européia (80/777/ECC), que inclui contagem total de colônias, ausência de parasitas e microrganismos patogênicos como: *E. coli*, coliformes, *Streptococcus faecalis*, anaeróbios sulfito redutores esporulados e *Pseudomonas aeruginosa*.

Tabela 3: Especificações propostas para águas minerais naturais envasadas dadas pela Comunidade Econômica Européia (80/777/EEC)

<p>Contagem total de colônias / 12h após envase, mantidas a temperatura $4 \pm 1^\circ\text{C}$</p> <ul style="list-style-type: none"> • 100/mL - 20 - 22°C - 72h • 20/mL - 35 - 37°C - 24h
<p>Ausência de parasitas e microrganismos patogênicos</p> <ul style="list-style-type: none"> • Coliformes / 250mL • <i>Escherichia coli</i> / 250mL • <i>Streptococcus faecalis</i> / 250mL • Anaeróbios sulfito redutores esporulados / 50mL • <i>Pseudomonas aeruginosa</i> / 250mL

Na tabela 4 estão demonstradas as propostas da Legislação Espanhola pelo real decreto 2119/81, onde as análises estão divididas conforme o local de coleta. Se for água de fonte pede-se ausência em 100mL de parasitas e microrganismos patogênicos, enterobactérias (*E. coli* e salmonelas) *Streptococcus faecalis* e esporos de *Clostridium* sulfito redutores; se a água for de mercado pede-se ausência em 100mL de todos os microrganismos anteriores, *Pseudomonas aeruginosa* e *S. aureus* (Vieira, 1989).

Tabela 4: Especificações propostas para águas minerais naturais envasadas dadas pela Legislação Espanhola (Real Decreto 2119/81)

<p>Na fonte</p> <p>Ausência, em 100mL, de parasitas e microrganismos patogênicos:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Enterobactérias: <i>Escherichia coli</i> e salmonelas • <i>Streptococcus faecalis</i> (Grupo D) • Esporos de <i>Clostridium</i> sulfito redutores
<p>No mercado</p> <p>Ausência em 100mL de:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Todos os microrganismos anteriores • <i>Pseudomonas aeruginosa</i> • <i>Staphylococcus aureus</i>

Pelo substrato cromogênico ser um método novo, optou-se por dar continuidade a fim de identificar as bactérias presentes nas amostras.

4.2. Isolamento e identificação das bactérias presentes nas cavidades positivas

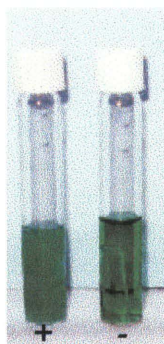
As cavidades positivas foram repicadas para o verde brilhante lactose bile a 2% e para o ágar eosina azul de metileno (E.M.B.) segundo Levine.

4.2.1. Verde brilhante lactose bile a 2%

As cinco cavidades amarelas foram transferidas para tubos de verde brilhante com o metilumbeliferil-β-D-glucoronídeo (MUG) (item 3), que é um caldo seletivo para coliformes totais. O resultado foi positivo em quatro tubos

de verde brilhante, que representam duas cavidades da marca **A** e duas da **B**. Na Figura 11 está representado um tubo positivo com turvação e gás e um negativo.

Figura 11: Tubo de verde brilhante positivo com turvação e produção de gás (à esquerda) e tubo de verde brilhante negativo (à direita).

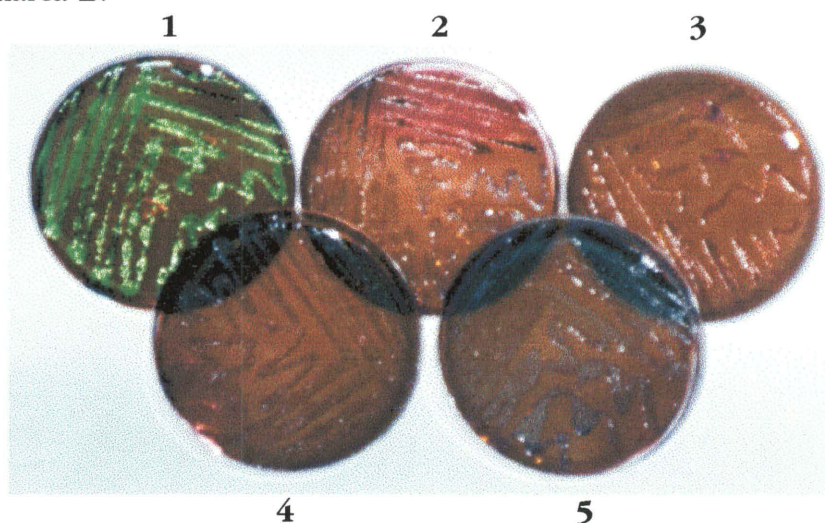


O teste para coliformes fecais (*E. coli*) corroborou o resultado das cartelas, pois os tubos de verde brilhante com MUG, quando expostos à luz ultravioleta, não apresentaram fluorescência azul.

4.2.2. Ágar eosina azul de metileno (EMB) segundo Levine

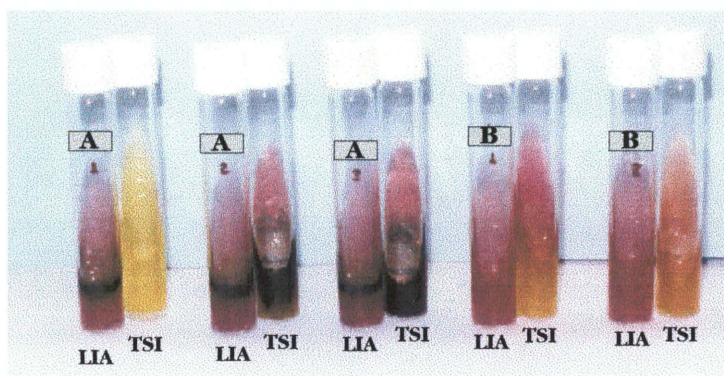
As cinco cavidades amarelas foram estriadas cada uma em uma placa de EMB com auxílio de alças descartáveis. O meio EMB é seletivo para bactérias gram negativas fermentadoras ou não da glicose. As cinco placas apresentaram crescimento (Figura 12) confirmando a presença de bactérias gram negativas.

Figura 12: Placas de ágar eosina azul de metileno (EMB) segundo Levine, com crescimento. As placas 1, 2 e 3 representam as cavidades amarelas da marca **A**; e as placas 4 e 5 as cavidades amarelas da marca **B**.



As colônias que cresceram nas placas de EMB foram isoladas no ágar três açúcares e ferro (TSI) e no ágar lisina-ferro (LIA) (Figura 13).

Figura 13: Colônias isoladas no meio TSI e LIA.



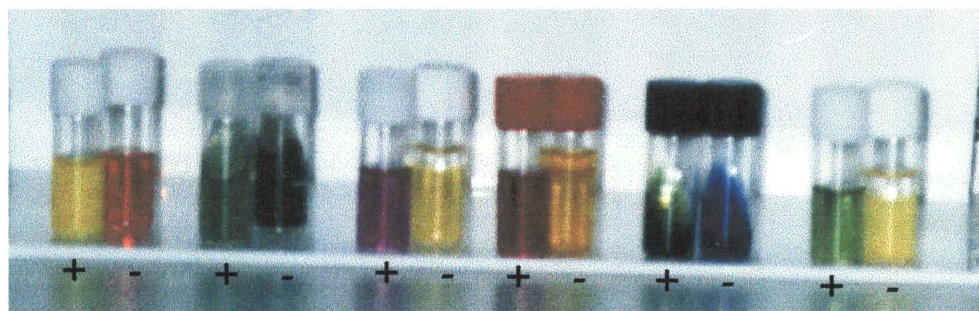
Para identificar as bactérias das colônias isoladas foi utilizado o mini kit da Newprov para enterobactérias (Figura 14). Após a leitura os resultados foram colocados numa tabela, conforme as especificações da Newprov. As provas positivas são consideradas numericamente pelo valor expresso ao lado da prova; o primeiro número corresponde à somatória dos valores positivos das primeiras três colunas, o segundo corresponde à somatória das próximas três colunas, o terceiro à somatória das três colunas seguintes e o último

corresponde à somatória das duas últimas colunas. O valor obtido no final representa a espécie encontrada no manual da Newprov para identificação de enterobactérias (Tabela 5). Das cinco cavidades positivas, quatro apresentaram enterobactérias, que são coliformes e em uma cavidade (**A3**) detectou-se a presença de um microrganismo não coliforme, gram negativo não fermentador da glicose.

Tabela 5: Tabela da Newprov para identificação de enterobactérias.

Amostra nº	Phe (6)	Lac (2)	H ₂ S (1)	Glu (6)	Gás (2)	Lis (1)	I (6)	Crn (2)	Mot (1)	KK (2)	Rha (1)	Total	Identificação
B 1	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	0933	<i>Enterobacter gergoviae</i>
B 2	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	2733	<i>Enterobacter aerogenes</i>
A 1	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	3811	<i>Citrobacter freundii</i>
A 2	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	0933	<i>Enterobacter gergoviae</i>
A 3	-	-	-	-	-	+	-	+	+	?	?	?	não fermentador

Figura 14: Mini kit da Newprov para identificação de enterobactérias, mostrando uma prova positiva e uma negativa.



As enterobactérias identificadas nas duas cavidades da marca **B** foram os coliformes *Enterobacter gergoviae* e *E. aerogenes* e em duas cavidades da marca **A** detectou-se os coliformes *E. gergoviae* e *Citrobacter freundii*. A terceira cavidade da marca **A** foi quem apresentou um microrganismo não coliforme, que não foi identificado.

As quatro cavidades que apresentaram resultado positivo para coliformes totais concordam com o método, no entanto a cavidade que apresentou um microrganismo não coliforme colocou em dúvida sua eficácia, pois, segundo o método, toda coloração amarela indica a presença de coliformes totais.

A presença desses microrganismos não coliformes vem sendo discutida. Segundo EDBERG *et al.* (1988), comparando o substrato cromogênico com o método padrão dos tubos múltiplos, a presença de bactérias gram negativas que produzem pequena quantidade da enzima ONPG em um período de 24 horas, são capazes de alterar a coloração de incolor para amarelo quando em alta concentração, dando portanto um resultado positivo.

Dessa forma, apesar da existência de bactérias não coliformes em uma das cavidades, identificou-se em outras duas cavidades a presença de coliformes totais, numa mesma cartela, o que indica que eles podem estar associados.

5. CONCLUSÃO

Apesar do número de amostras não ser significativo os resultados encontrados são válidos, pois a presença de coliformes em águas minerais naturais envasadas indica a falta de cuidados sanitários, bem como, problemas nas operações de captação, decantação, canalização, elevação mecânica, provisão em reservatórios, filtração, envasamento, carbonatação ou outros que possam alterar as propriedades características e a composição das mesmas.

É necessário que sejam feitos novos estudos sobre águas minerais envasadas para se estabelecer melhores critérios microbiológicos, pois tanto essa pesquisa como outras comprovaram a existência de microrganismos indicadores de condições higiênicas inadequadas. O próprio Codex Alimentarius Commission (1984) já sugere novas especificações para as análises de águas minerais.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALCHIN, W.G.V. Water: a world problem. In: WATER and the environment. Amsterdam : Gordon and Breach Science Publishers, 1991. p. 361-368.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 25, de 1976. Estabelece padrões de identidade e qualidade para águas minerais e água natural de fonte. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, de 16 de março de 1977.

CHROMOGENIC substrate coliform test: method 9223. In: APHA. **Standard methods for the examination of water and wastewater:** part 9000: microbiological examination. 19. ed. Washington, 1995. p. 9-51.

CODEX ALIMENTARIUS. **Azúcares, productos del cacao y el chocolate y productos varios.** Roma, Itália: FAO/OMS, [1995]. v.11.

EDBERG, Stephen C., ALLEN, M.J., SMITH, D.B.. National field evaluation of a defined substrate method for the simultaneous enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* from drinking water: comparison with the standard multiple tube fermentation method. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, n.6, p.1595 -1601, Jun.1988.

LEITÃO, M.F.F. **Tratado de microbiologia:** microbiologia de alimentos, sanitária e industrial. [São Paulo] : Manole, 1988. v. 1. 186 p.

SILVA, N. da, JUNQUEIRA, V.C.A. **Métodos de análise microbiológica de alimentos.** Campinas : SILVA & JUNQUEIRA, 1995. 229 p. (Manual Técnico, 14).

VIEIRA, M. B. C. M. Água mineral: aspectos microbiológicos e a legislação vigente. In: ENCONTRO NACIONAL DE ANALISTAS DE ALIMENTOS, 4., Belo Horizonte, 03-07 de outubro de 1988. **Anais...** Belo Horizonte : Lemi, 1989. p. 125-130.

ANEXO

IDEXX Quanti-Tray/2000 MPN Table
Small Wells Positive

# Large Wells Positive	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
0	0.0	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0	10.0	11.0	12.0	13.0	14.0	15.1	16.1	17.1	18.1	19.1	20.2	21.2	22.2	23.2	24.3
1	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.1	9.1	10.1	11.1	12.1	13.2	14.2	15.2	16.2	17.3	18.3	19.3	20.4	21.4	22.4	23.5	24.5	25.6
2	2.0	3.0	4.1	5.1	6.1	7.1	8.1	9.2	10.2	11.2	12.2	13.3	14.3	15.3	16.4	17.4	18.5	19.5	20.6	21.6	22.6	23.7	24.8	25.8	26.9
3	3.1	4.1	5.1	6.1	7.2	8.2	9.2	10.3	11.3	12.4	13.4	14.4	15.5	16.5	17.6	18.6	19.7	20.8	21.8	22.9	23.9	25.0	26.1	27.1	28.2
4	4.1	5.2	6.2	7.2	8.3	9.3	10.4	11.4	12.5	13.5	14.6	15.6	16.7	17.8	18.8	19.9	21.0	22.0	23.1	24.2	25.2	26.3	27.4	28.5	29.6
5	5.2	6.3	7.3	8.4	9.4	10.5	11.5	12.6	13.7	14.7	15.8	16.9	17.9	19.0	20.1	21.2	22.2	23.3	24.4	25.5	26.6	27.7	28.8	29.9	31.0
6	6.3	7.4	8.4	9.5	10.6	11.6	12.7	13.8	14.9	15.9	17.0	18.1	19.2	20.3	21.4	22.5	23.6	24.7	25.8	26.9	28.0	29.1	30.2	31.3	32.4
7	7.4	8.5	9.6	10.7	11.8	12.8	13.9	15.0	16.1	17.2	18.3	19.4	20.5	21.6	22.7	23.8	24.9	26.0	27.1	28.3	29.4	30.5	31.6	32.8	33.9
8	8.6	9.7	10.8	11.9	13.0	14.1	15.2	16.3	17.4	18.5	19.6	20.7	21.8	22.9	24.1	25.2	26.3	27.4	28.6	29.7	30.8	32.0	33.1	34.3	35.4
9	9.8	10.9	12.0	13.1	14.2	15.3	16.4	17.5	18.7	19.8	20.9	22.0	23.2	24.3	25.4	26.6	27.7	28.9	30.0	31.2	32.3	33.5	34.6	35.8	37.0
10	11.0	12.1	13.2	14.3	15.5	16.6	17.7	18.9	20.0	21.1	22.3	23.4	24.6	25.7	26.9	28.0	29.2	30.3	31.5	32.7	33.8	35.0	36.2	37.4	38.6
11	12.2	13.4	14.5	15.6	16.8	17.9	19.1	20.2	21.4	22.5	23.7	24.8	26.0	27.2	28.3	29.5	30.7	31.9	33.0	34.2	35.4	36.6	37.8	39.0	40.2
12	13.5	14.6	15.8	16.9	18.1	19.3	20.4	21.6	22.7	23.9	25.1	26.3	27.5	28.6	29.8	31.0	32.2	33.4	34.6	35.8	37.0	38.2	39.4	40.7	41.9
13	14.8	16.0	17.1	18.3	19.5	20.6	21.8	23.0	24.2	25.4	26.6	27.8	29.0	30.2	31.4	32.6	33.8	35.0	36.2	37.5	38.7	39.9	41.1	42.4	43.6
14	16.1	17.3	18.5	19.7	20.9	22.1	23.3	24.4	25.7	26.9	28.1	29.3	30.5	31.7	33.0	34.2	35.4	36.7	37.9	39.1	40.4	41.6	42.9	44.2	45.4
15	17.5	18.7	19.9	21.1	22.3	23.5	24.7	25.9	27.2	28.4	29.6	30.9	32.1	33.3	34.6	35.8	37.1	38.4	39.6	40.9	42.2	43.4	44.7	46.0	47.3
16	18.9	20.1	21.3	22.6	23.8	25.0	26.2	27.5	28.7	30.0	31.2	32.5	33.7	35.0	36.3	37.5	38.8	40.1	41.4	42.7	44.0	45.3	46.6	47.9	49.2
17	20.3	21.6	22.8	24.0	25.3	26.5	27.8	29.1	30.3	31.6	32.9	34.1	35.4	36.7	38.0	39.3	40.6	41.9	43.2	44.5	45.9	47.2	48.5	49.8	51.2
18	21.8	23.1	24.3	25.6	26.9	28.1	29.4	30.7	32.0	33.3	34.6	35.9	37.2	38.5	39.8	41.1	42.4	43.8	45.1	46.4	47.8	49.1	50.5	51.9	53.2
19	23.3	24.6	25.9	27.2	28.5	29.8	31.1	32.4	33.7	35.0	36.3	37.6	38.9	40.3	41.6	43.0	44.3	45.7	47.1	48.4	49.8	51.2	52.6	54.0	55.4
20	24.9	26.2	27.5	28.8	30.1	31.4	32.8	34.1	35.4	36.8	38.1	39.5	40.8	42.2	43.6	44.9	46.3	47.7	49.1	50.5	51.9	53.3	54.7	56.1	57.6
21	26.5	27.8	29.2	30.5	31.8	33.2	34.5	35.9	37.3	38.6	40.0	41.4	42.8	44.1	45.5	46.9	48.4	49.8	51.2	52.6	54.1	55.5	56.9	58.4	59.9
22	28.2	29.5	30.9	32.3	33.6	35.0	36.4	37.7	39.1	40.5	41.9	43.3	44.7	46.2	47.6	49.0	50.5	51.9	53.4	54.8	56.3	57.8	59.3	60.7	62.2
23	29.9	31.3	32.7	34.1	35.4	36.8	38.2	39.7	41.1	42.5	43.9	45.4	46.8	48.3	49.7	51.2	52.7	54.2	55.6	57.1	58.6	60.2	61.7	63.2	64.7
24	31.7	33.1	34.5	35.9	37.3	38.8	40.2	41.6	43.1	44.6	46.0	47.5	49.0	50.5	51.9	53.4	55.0	56.5	58.0	59.5	61.1	62.6	64.2	65.8	67.3
25	33.5	35.0	36.4	37.9	39.3	40.8	42.2	43.7	45.2	46.7	48.2	49.7	51.2	52.7	54.3	55.8	57.3	58.9	60.5	62.0	63.6	65.2	66.8	68.4	70.0
26	35.5	36.9	38.4	39.9	41.3	42.8	44.3	45.9	47.4	48.9	50.4	52.0	53.5	55.1	56.7	58.2	59.8	61.4	63.0	64.7	66.3	67.9	69.6	71.2	72.9
27	37.4	38.9	40.4	41.9	43.5	45.0	46.5	48.1	49.6	51.2	52.8	54.4	56.0	57.6	59.2	60.8	62.4	64.1	65.7	67.4	69.1	70.8	72.5	74.2	75.9
28	39.5	41.0	42.6	44.1	45.7	47.2	48.8	50.4	52.0	53.6	55.2	56.9	58.5	60.1	61.8	63.5	65.2	66.9	68.6	70.3	72.0	73.7	75.5	77.3	79.0
29	41.6	43.2	44.8	46.4	48.0	49.6	51.2	52.8	54.5	56.1	57.8	59.5	61.2	62.9	64.6	66.3	68.0	69.8	71.5	73.3	75.1	76.9	78.7	80.5	82.3
30	43.9	45.5	47.1	48.7	50.4	52.0	53.7	55.4	57.1	58.8	60.5	62.2	64.0	65.7	67.5	69.3	71.0	72.8	74.7	76.5	78.3	80.2	82.1	84.0	85.9
31	46.2	47.9	49.5	51.2	52.9	54.6	56.3	58.1	59.8	61.6	63.3	65.1	66.9	68.7	70.5	72.4	74.2	76.1	78.0	79.9	81.8	83.7	85.7	87.6	89.6
32	48.7	50.4	52.1	53.8	55.6	57.3	59.1	60.9	62.7	64.5	66.3	68.1	70.0	71.9	73.8	75.7	77.6	79.5	81.5	83.5	85.4	87.5	89.5	91.5	93.6
33	51.2	53.0	54.7	56.5	58.3	60.1	62.0	63.8	65.7	67.6	69.5	71.4	73.3	75.2	77.2	79.2	81.2	83.2	85.2	87.3	89.3	91.4	93.5	95.7	97.8
34	53.9	55.7	57.6	59.4	61.3	63.1	65.0	66.9	68.9	70.8	72.8	74.8	76.8	78.8	80.8	82.9	85.0	87.1	89.2	91.4	93.5	95.7	97.9	100.1	102.4
35	56.8	58.6	60.5	62.4	64.4	66.3	68.3	70.3	72.3	74.3	76.3	78.4	80.5	82.6	84.7	86.9	89.1	91.3	93.5	95.7	98.0	100.3	102.6	105.0	107.3
36	59.8	61.7	63.7	65.7	67.7	69.7	71.7	73.8	75.9	78.0	80.1	82.3	84.5	86.7	88.9	91.2	93.5	95.8	98.1	100.5	102.9	105.3	107.7	110.2	112.7
37	62.9	65.0	67.1	69.1	71.2	73.3	75.4	77.6	79.8	82.0	84.2	86.5	88.8	91.1	93.4	95.8	98.2	100.6	103.1	105.6	108.1	110.7	113.3	115.9	118.6
38	66.3	68.4	70.6	72.7	74.9	77.1	79.4	81.6	83.9	86.2	88.6	91.0	93.4	95.8	98.3	100.8	103.4	105.9	108.6	111.2	113.9	116.6	119.4	122.2	125.0
39	69.9	72.2	74.4	76.6	78.9	81.3	83.6	86.0	88.4	90.9	93.3	95.9	98.4	101.0	103.6	106.3	109.0	111.8	114.5	117.4	120.3	123.2	126.1	129.2	132.2
40	73.8	76.2	78.5	80.9	83.3	85.7	88.2	90.7	93.3	95.9	98.5	101.2	103.9	106.7	109.5	112.4	115.3	118.2	121.2	124.2	127.3	130.5	133.7	137.0	140.3
41	78.0	80.5	83.0	85.5	88.0	90.6	93.3	95.9	98.7	101.4	104.3	107.1	110.0	113.0	116.0	119.1	122.2	125.4	128.7	132.0	135.3	138.8	142.3	145.9	149.5
42	82.6	85.2	87.8	90.5	93.2	96.0	98.8	101.7	104.6	107.6	110.6	113.7	116.9	120.1	123.3	126.7	130.1	133.6	137.1	140.8	144.5	148.3	152.2	156.1	160.2
43	87.6	90.4	93.2	96.0	99.0	101.9	105.0	108.1	111.2	114.5	117.8	121.1	124.5	128.1	131.7	135.4	139.1	143.0	147.0	151.0	155.1	159.4	163.8	168.2	172.8
44	93.1	96.1	99.1	102.2	105.4	108.6	111.9	115.3	118.7	122.3	125.9	129.6	133.4	137.4	141.4	145.5	149.7	154.1	158.5	163.1	167.8	172.7	177.7	182.9	188.2
45	99.3	102.5	105.8	109.2	112.6	116.2	119.8	123.6	127.4	131.3	135.4	139.6	143.9	148.3	152.9	157.6	162.4	167.4	172.6	177.9	183.5	189.2	195.1	201.2	207.5
46	106.3	109.8	113.4	117.2	121.0	125.0	129.1	133.3	137.6	142.1	146.7	151.5	156.5	161.6	166.9	172.5	178.2	184.2	190.4	196.8	203.5	210.5	217.8	225.4	233.3
47	114.3	118.3	122.4	126.6	130.9	135.4	140.1	145.0	150.0	155.3	160.7	166.4	172.3	178.5	185.0	191.8	198.9	206.3	214.2	222.4	231.0	240.0	249.5	259.5	270.0
48	123.9	128.4	133.1	137.9	143.0	148.3	153.9	159.7	165.8	172.2	178.9	186.0	193.5	201.4	209.8	218.7	228.2	238.2	248.9	260.2	272.3	285.1	298.7	313.0	328.2
49	135.5	140.8	146.4	152.3	158.5	165.0	172.0	179.3	187.2	195.6	204.6	214.3	224.7	235.9	248.1	261.3	275.5	290.9	307.6	325.5	344.8	365.4	387.3	410.6	435.2

IDEXX Quanti-Tray/2000 MPN Table
Small Wells Positive

# Large Wells Positive	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
0	25.3	26.3	27.4	28.4	29.5	30.5	31.5	32.6	33.6	34.7	35.7	36.8	37.8	38.9	39.9	41.0	42.1	43.1	44.2	45.3	46.3	47.4	48.5	49.5
1	26.6	27.6	28.7	29.7	30.8	31.9	32.9	34.0	35.0	36.1	37.2	38.2	39.3	40.4	41.4	42.5	43.6	44.7	45.7	46.8	47.9	49.0	50.1	51.2
2	27.9	29.0	30.0	31.1	32.2	33.2	34.3	35.4	36.5	37.5	38.6	39.7	40.8	41.9	42.9	44.0	45.1	46.2	47.3	48.4	49.5	50.6	51.7	52.8
3	29.3	30.3	31.4	32.5	33.6	34.7	35.7	36.8	37.9	39.0	40.1	41.2	42.3	43.4	44.5	45.6	46.7	47.8	48.9	50.0	51.2	52.3	53.4	54.5
4	30.7	31.7	32.8	33.9	35.0	36.1	37.2	38.3	39.4	40.5	41.6	42.8	43.9	45.0	46.1	47.2	48.3	49.5	50.6	51.7	52.9	54.0	55.1	56.3
5	32.1	33.2	34.3	35.4	36.5	37.6	38.7	39.8	41.0	42.1	43.2	44.3	45.5	46.6	47.7	48.9	50.0	51.2	52.3	53.5	54.6	55.8	56.9	58.1
6	33.5	34.6	35.8	36.9	38.0	39.1	40.3	41.4	42.6	43.7	44.8	46.0	47.1	48.3	49.4	50.6	51.7	52.9	54.1	55.2	56.4	57.6	58.7	59.9
7	35.0	36.2	37.3	38.4	39.6	40.7	41.9	43.0	44.2	45.3	46.5	47.7	48.8	50.0	51.2	52.3	53.5	54.7	55.9	57.1	58.2	59.4	60.6	61.8
8	36.5	37.7	38.9	40.0	41.2	42.3	43.5	44.7	45.9	47.0	48.2	49.4	50.6	51.8	53.0	54.1	55.3	56.5	57.7	58.9	60.2	61.4	62.6	63.8
9	38.1	39.3	40.5	41.6	42.8	44.0	45.2	46.4	47.6	48.8	50.0	51.2	52.4	53.6	54.8	56.0	57.2	58.4	59.7	60.9	62.1	63.4	64.6	65.8
10	39.7	40.9	42.1	43.3	44.5	45.7	46.9	48.1	49.3	50.6	51.8	53.0	54.2	55.5	56.7	57.9	59.2	60.4	61.6	62.9	64.2	65.4	66.7	67.9
11	41.4	42.6	43.8	45.0	46.3	47.5	48.7	49.9	51.2	52.4	53.6	54.9	56.1	57.4	58.6	59.9	61.2	62.4	63.7	65.0	66.2	67.5	68.8	70.1
12	43.1	44.3	45.6	46.8	48.1	49.3	50.5	51.8	53.1	54.3	55.6	56.8	58.1	59.4	60.7	61.9	63.2	64.5	65.8	67.1	68.4	69.7	71.0	72.3
13	44.9	46.1	47.4	48.6	49.9	51.2	52.4	53.7	55.0	56.3	57.6	58.9	60.2	61.5	62.8	64.1	65.4	66.7	68.0	69.3	70.7	72.0	73.3	74.7
14	46.7	48.0	49.3	50.5	51.8	53.1	54.4	55.7	57.0	58.3	59.6	60.9	62.3	63.6	64.9	66.3	67.6	68.9	70.3	71.6	73.0	74.4	75.7	77.1
15	48.6	49.9	51.2	52.5	53.8	55.1	56.4	57.8	59.1	60.4	61.8	63.1	64.5	65.8	67.2	68.5	69.9	71.3	72.6	74.0	75.4	76.8	78.2	79.6
16	50.5	51.8	53.2	54.5	55.8	57.2	58.5	59.9	61.2	62.6	64.0	65.3	66.7	68.1	69.5	70.9	72.3	73.7	75.1	76.5	77.9	79.3	80.8	82.2
17	52.5	53.9	55.2	56.6	58.0	59.3	60.7	62.1	63.5	64.9	66.3	67.7	69.1	70.5	71.9	73.3	74.8	76.2	77.6	79.1	80.5	82.0	83.5	84.9
18	54.6	56.0	57.4	58.8	60.2	61.6	63.0	64.4	65.8	67.2	68.6	70.1	71.5	73.0	74.4	75.9	77.3	78.8	80.3	81.8	83.3	84.8	86.3	87.8
19	56.8	58.2	59.6	61.0	62.4	63.9	65.3	66.7	68.2	69.7	71.1	72.6	74.1	75.5	77.0	78.5	80.0	81.5	83.1	84.6	86.1	87.6	89.2	90.7
20	59.0	60.4	61.9	63.3	64.8	66.3	67.7	69.2	70.7	72.2	73.7	75.2	76.7	78.2	79.8	81.3	82.8	84.4	85.9	87.5	89.1	90.6	92.2	93.8
21	61.3	62.8	64.3	65.8	67.3	68.8	70.3	71.8	73.3	74.9	76.4	77.9	79.5	81.0	82.6	84.2	85.8	87.4	89.0	90.6	92.2	93.8	95.4	97.1
22	63.7	65.3	66.8	68.3	69.8	71.4	72.9	74.5	76.1	77.6	79.2	80.8	82.4	84.0	85.6	87.2	88.9	90.5	92.1	93.8	95.5	97.2	98.9	100.5
23	66.3	67.8	69.4	71.0	72.5	74.1	75.7	77.3	78.9	80.5	82.1	83.8	85.4	87.1	88.7	90.4	92.1	93.8	95.5	97.2	98.9	100.6	102.3	104.1
24	68.9	70.5	72.1	73.7	75.3	77.0	78.6	80.2	81.9	83.6	85.2	86.9	88.6	90.3	92.0	93.8	95.5	97.2	99.0	100.7	102.5	104.3	106.1	107.9
25	71.7	73.3	75.0	76.6	78.3	80.0	81.6	83.3	85.0	86.8	88.5	90.2	92.0	93.7	95.5	97.3	99.1	100.9	102.7	104.5	106.3	108.2	110.0	111.9
26	74.6	76.3	78.0	79.7	81.4	83.1	84.8	86.6	88.4	90.1	91.9	93.7	95.5	97.3	99.2	101.0	102.9	104.7	106.6	108.5	110.4	112.3	114.2	116.2
27	77.6	79.4	81.1	82.9	84.6	86.4	88.2	90.0	91.9	93.7	95.5	97.4	99.3	101.2	103.1	105.0	106.9	108.8	110.8	112.7	114.7	116.7	118.7	120.7
28	80.8	82.6	84.4	86.2	88.1	89.9	91.8	93.7	95.6	97.5	99.4	101.3	103.3	105.2	107.2	109.2	111.2	113.2	115.2	117.3	119.3	121.4	123.5	125.6
29	84.2	86.1	87.9	89.8	91.7	93.6	95.6	97.5	99.5	101.5	103.5	105.5	107.5	109.5	111.6	113.7	115.7	117.8	120.0	122.1	124.2	126.4	128.6	130.8
30	87.8	89.7	91.7	93.6	95.6	97.6	99.6	101.6	103.7	105.7	107.8	109.9	112.0	114.1	116.3	118.5	120.6	122.8	125.1	127.3	129.5	131.8	134.1	136.4
31	91.6	93.6	95.6	97.7	99.7	101.8	103.9	106.0	108.2	110.3	112.5	114.7	116.9	119.1	121.4	123.6	125.9	128.2	130.5	132.9	135.3	137.7	140.1	142.5
32	95.7	97.7	99.9	102.0	104.2	106.3	108.5	110.7	113.0	115.2	117.5	119.8	122.1	124.5	126.8	129.2	131.6	134.0	136.5	139.0	141.5	144.0	146.6	149.1
33	100.0	102.2	104.4	106.6	108.9	111.2	113.5	115.8	118.2	120.5	122.9	125.3	127.8	130.3	132.8	135.3	137.8	140.4	143.0	145.6	148.3	150.9	153.6	156.4
34	104.7	107.0	109.3	111.7	114.0	116.4	118.9	121.3	123.8	126.3	128.8	131.4	134.0	136.6	139.2	141.9	144.6	147.3	150.1	152.9	155.7	158.6	161.5	164.4
35	109.7	112.2	114.6	117.1	119.6	122.1	124.7	127.3	129.9	132.6	135.3	138.0	140.8	143.6	146.4	149.2	152.1	155.0	158.0	161.0	164.0	167.1	170.2	173.3
36	115.2	117.8	120.4	123.0	125.7	128.4	131.1	133.9	136.7	139.5	142.4	145.3	148.3	151.3	154.3	157.3	160.4	163.6	166.8	170.0	173.3	176.6	179.9	183.3
37	121.3	124.0	126.8	129.6	132.4	135.3	138.2	141.2	144.2	147.2	150.3	153.5	156.6	159.9	163.1	166.4	169.8	173.2	176.7	180.2	183.7	187.3	191.0	194.7
38	127.9	130.8	133.8	136.8	139.9	143.0	146.1	149.3	152.6	155.9	159.2	162.6	166.1	169.6	173.2	176.8	180.4	184.2	188.0	191.8	195.7	199.6	203.7	207.7
39	135.3	138.5	141.7	145.0	148.3	151.7	155.1	158.6	162.1	165.7	169.4	173.1	176.9	180.7	184.7	188.6	192.7	196.8	201.0	205.3	209.6	214.0	218.5	223.0
40	143.7	147.1	150.6	154.2	157.8	161.5	165.3	169.1	173.0	177.0	181.1	185.2	189.4	193.7	198.1	202.5	207.0	211.7	216.4	221.1	226.0	231.0	236.0	241.1
41	153.2	157.0	160.9	164.8	168.9	173.0	177.2	181.4	185.8	190.3	194.8	199.5	204.2	209.1	214.0	219.0	224.2	229.4	234.8	240.2	245.8	251.5	257.2	263.1
42	164.3	168.6	172.9	177.3	181.9	186.5	191.3	196.1	201.1	206.2	211.4	216.7	222.1	227.7	233.4	239.2	245.2	251.3	257.5	263.8	270.3	276.9	283.6	290.5
43	177.5	182.3	187.3	192.4	197.6	202.9	208.4	214.0	219.8	225.8	231.8	238.1	244.5	251.0	257.7	264.6	271.7	278.9	286.3	293.8	301.5	309.4	317.4	325.6
44	193.6	199.3	205.0	211.0	217.2	223.5	230.0	236.7	243.6	250.7	258.1	265.6	273.3	281.2	289.4	297.8	306.3	315.1	324.1	333.3	342.8	352.4	362.3	372.4
45	214.1	220.9	227.9	235.1	242.7	250.4	258.4	266.7	275.3	284.1	293.2	302.6	312.3	322.3	332.5	343.0	353.8	364.9	376.2	387.9	399.8	412.0	424.5	437.4
46	241.5	250.0	258.9	268.2	277.8	287.7	298.1	308.8	319.9	331.4	343.3	355.5	368.1	381.1	394.5	408.3	422.5	437.0	452.0	467.4	483.3	499.5	516.3	533.5
47	280.9	292.4	304.4	316.9	330.0	343.6	357.8	372.5	387.7	403.4	419.8	436.6	454.1	472.1	490.7	509.9	529.8	550.4	571.7	593.8	616.7	640.5	665.3	691.0
48	344.1	360.9	378.4	396.8	416.0	436.0	456.9	478.6	501.2	524.7	549.2	574.8	601.5	629.4	658.6	689.3	721.5	755.5	791.5	829.7	870.4	913.9	960.6	1011.1
49	461.1	488.4	517.2	547.5	579.4	613.1	648.8	686.7	727.0	770.1	816.4	866.4	920.8	980.4	1046.2	1119.9	1203.3	1299.7	1413.6	1553.1	1732.9	1986.3	2419.2	>2419.2