

**RECUPERAÇÃO DE *SALMONELLA* SPP. EM MANGA (*MANGIFERA INDICA*)
CV. TOMMY ATKINS**

Silvana Belém de Oliveira Vilar

Doutoranda em Tecnologia de Alimentos /FEA- UNICAMP
silvanatecal@gmail.com

Maria Fernanda Pontes Penteado Moretzhon de Castro

Doutora em Tecnologia de alimentos/UNICAMP
fernanda@ital.sp.gov.br

Ana Carolina Rezende

Doutora em Ciência dos Alimentos /Universidade de São Paulo (USP)
caroll_rezende@yahoo.com.br

Ana Lúcia Penteado

Doutorado em Tecnologia de Alimentos /UNICAMP
analucia.penteado@embrapa.br

Flávio Luís Schmidt

PhD em Ciência de alimentos/ UNICAMP
schmidt.unicamp@gmail.com

RESUMO

Salmonella spp. é um patógeno que se destaca como agente responsável por doenças veiculadas por alimentos. Alguns estudos demonstram que o consumo de manga contaminada foi responsável por alguns destes surtos. Este trabalho objetivou investigar a eficiência de diferentes metodologias para a recuperação de *Salmonella* em manga (*Mangifera indica*) cv. Tommy Atkins. Para o estudo, as mangas foram artificialmente contaminadas com um pool de *Salmonella* contendo culturas de *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Brasil. Foram comparados dois métodos de recuperação: Esfregação de Superfície (*Swab*) e Fragmento do Fruto. A contagem foi realizada de duas maneiras: por Semeadura em Superfície em meio MLCB e pela metodologia de Duas Camadas de Ágar (ágar não seletivo + sobrecamada de ágar seletivo) utilizando-se neste caso os meios de cultura TSA +MLCB ou TSA + XLD. Após análise estatística dos dados obtidos por Análise de Variância e Teste de Tukey observou-se que houve diferenças e que os melhores resultados foram obtidos quando se utilizou a combinação do Fragmento do Fruto, com a recuperação nos meios TSA + MLCB. Concluiu-se que esse método foi eficiente na recuperação de cepas de *Salmonella* artificialmente inoculadas em mangas cv. Tommy Atkins no estágio de maturação 2.

Palavras-chave: Células injuriadas, Doenças veiculadas por alimentos, Frutas.

ABSTRACT

Salmonella spp. is a pathogen that stands out as an agent responsible for foodborne illnesses. Some studies have shown that consumption of contaminated mango was responsible for some of these outbreaks. This study aimed to investigate the effectiveness of different methodologies for *Salmonella* recovery in mango (*Mangifera indica*) cv. Tommy Atkins. For the study, the mangoes were artificially contaminated with a pool containing cultures of *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Brazil. Two recovery methods were compared: Surface Smear (Swab) and Fragment Fruit. Counting was done in two ways: sowing Surface among MLCB and by the methodology of two layers Agar (non-selective agar + selective agar overlay) using, in this case, the TSA culture media + MLCB or TSA + XLD. After statistical analysis of data obtained by ANOVA and Tukey test it was observed that there were differences and that the best results were obtained when using the combination Fragment Fruit with the recovery in the TSA + MLCB medium. It was concluded that this method was effective in the recovery of *Salmonella* strains artificially inoculated in mangoes cv. Tommy Atkins in the maturation stage 2.

Keywords: Injured cells, Foodborne illnesses, Fruit.

1. INTRODUÇÃO

Considerando os problemas de doenças transmitidas por alimentos, a *Salmonella* aparece como um dos agentes mais importantes em surtos de toxinfecções alimentares. Um estudo realizado em 2012 pelo CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) estimou que nos Estados Unidos (EUA) entre os anos 2000 e 2008, cerca de um milhão de pessoas adoeceram, 19.000 foram hospitalizadas e 380 morreram devido à ingestão de alimentos contaminados com *Salmonella* spp. (apenas para o grupo não-tifóide).

Alimentos de origem vegetal vêm se destacando como veículos desse patógeno, pois normalmente são consumidos crus. Alguns surtos documentados constataram a transmissão de *Salmonella* através de tomate, couve, melancia, melão, maçã, alface e manga (TAUXE et al., 1997; BRACKETT, 1999). Ainda segundo o CDC (2013), em 2012, 127 pessoas foram infectadas com a cepa *Salmonella* Braenderup nos EUA em 15 estados. Neste surto 33 pessoas foram hospitalizadas, não havendo óbitos. Um rastreamento feito por técnicos dos CDC, órgão governamental americano responsável pelo monitoramento de doenças indicou que mangas provenientes do México foram fonte deste surto, já que esse patógeno pode internalizar nos frutos contaminando sua polpa (PENTEADO et al., 2004; BORDINI et al., 2007). Nesse caso, o país importador aplicou sanções proibindo a entrada de mangas provenientes da fazenda que exportou os frutos. Fatores ambientais, incluindo fontes de água contaminada usada para irrigar e lavar os vegetais têm sido indicadas em um grande número de surtos (DEERING et al., 2012), além disso, a capacidade da *Salmonella*

de internalizar em manga pode ser outro fator que aumenta a chance de torná-la veículo provável desta bactéria (PENTEADO et al., 2004).

É necessário o estudo de técnicas que aprimorem a detecção desse patógeno em alimentos. Segundo Albuquerque (2000), são muitas as variáveis consideradas importantes e que limitam a recuperação de *Salmonella*, as quais incluem tipos de meios de cultura e os materiais examinados, portanto, as técnicas para recuperação de salmonela devem ser adaptadas para o tipo de material examinado. O objetivo do presente trabalho foi investigar a eficiência de diferentes metodologias e meios de cultura para a recuperação de *Salmonella* inoculada artificialmente em manga cv. Tommy Atkins.

2. METODOLOGIA

2.1. Preparação do inóculo: Essa metodologia foi fundamentada nos estudos de Strawn; Danyluk (2009), com modificações adaptadas pelos autores do presente trabalho. Um *pool* de *Salmonella* spp. composto por culturas individuais de *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Enteritidis (isolado de aves de capoeira) e *Salmonella* Brasil (isolado do açaí), doados, respectivamente, pelo Centro Tecnológico de Carnes (CTC) do Instituto Tecnológico de Alimentos (ITAL), SP, Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA) (Unicamp), SP e Embrapa Agroindústria de Alimentos (CTAA) foram usados nos experimentos. As cepas bacterianas de cada cultura estavam mantidas em *trypticase soy Agar* (TSA), marca Oxoid, Basingstoke, U.K, inclinado. Uma alçada de cada cultura foi transferida para tubos contendo 5 ml de caldo triptona de soja (TSB; pH 7,3; Difco Laboratories; Detroit, Michigan; EUA) e incubados a 37°C por 24 horas. Em seguida as cepas bacterianas de cada cultura foram transferidas para um Erlenmeyer contendo 100 mL de TSB e incubados a 37°C durante 24 horas. Após este período, 15 mL de cada cultura de *Salmonella* foram transferidos para um tubo de centrífuga, totalizando 45 mL do *pool* de *Salmonella* que foi centrifugado a 5500G (Hettich, Tuttlingen, Alemanha) durante 15 minutos a 21°C. Os sedimentos de células foram ressuspensos em 100 mL de água destilada estéril. A concentração final do *pool* de *Salmonella* no inóculo foi determinada através de diluições em série, plaqueamento em Xilose Lisina Desoxicolato (XLD) (Oxoid, Basingstoke, U.K) e incubação a 37°C durante 24 h.

2.2. Contaminação das mangas: Para cada tratamento (descritos nos itens 2.2.1 e 2.2.2), utilizaram-se cinco frutos, os mesmos foram lavados com água destilada estéril, secaram em cabine de segurança biológica por 30 minutos, após efetuou-se a inoculação. Utilizaram-se mangas cv. Tommy Atkins adquiridas no CEASA de Campinas – SP, no estádio de maturação 2 (conforme escala proposta por Assis, 2004). Os frutos intactos foram inoculados com 100µL do *pool* de *Salmonella* na superfície da casca em uma área demarcada previamente de 5cm² com auxílio de uma régua e um lápis. Após inoculação, os frutos continuaram na cabine de segurança biológica por duas horas, para secagem do inóculo e, em seguida, as mangas foram armazenadas a 7°C por 16 horas (Beuchat; Scouten, 2004).

2.2.1. Comparação dos métodos de recuperação: Foram estudados dois métodos de recuperação, por Esfregão de Superfície por *Swab* e utilizando Fragmentos do Fruto. Nos testes com *Swab*, a área demarcada dos frutos foi friccionada quarenta vezes com *Swab* umedecido em água peptonada estéril (0,1% p/v). Foi utilizado um esfregão por fruto. Após a fricção cada haste foi imersa em um tubo contendo 40 ml de água peptonada estéril (0,1% p/v) e realizadas as análises microbiológicas. Os testes com Fragmento do Fruto foram fundamentados na metodologia de Beuchat; Scouten (2004) adaptado para manga. A área demarcada de 5cm² e 1 cm de profundidade foi cuidadosamente cortada com o auxílio de bisturi de aço inoxidável estéril. O fragmento obtido foi colocado em um saco de *stomacher* estéril adicionado de 40 ml de água peptonada estéril (0,1% p/v) e levemente macerado usando um pequeno martelo. A mistura foi homogeneizada em *stomacher* em velocidade de 40 rpm durante 1 minuto. Em ambos os tratamentos, nos líquidos homogeneizados foram realizadas diluições decimais seriadas e contagem em duplicata sobre o meio MLCB (*Mannitol Lysine Crystal Violet Brilliant Green* - Oxoid, Basingstoke, U.K) e incubadas a 37°C por 24 horas.

2.2.2. Contagem das células: Definido o melhor método de recuperação das cepas bacterianas nas mangas artificialmente contaminadas, foram comparados dois métodos de contagem das células, o método convencional de Semeadura em Superfície (SS) e o método Duas Camadas de Ágar (DCA), ambos repetidos cinco vezes. Todos os testes foram realizados em cabine de segurança biológica. No método convencional diluições seriadas (0,1mL) foram semeadas em duplicata sobre o meio MLCB e incubadas a 37°C por 24 horas. No método DCA as diluições seriadas (0,1mL) foram semeadas em duplicata em placas contendo 14 mL de TSA estéril solidificado e incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 2 horas para permitir a recuperação das células lesadas. Em seguida o meio MLCB ou o meio XLD foi sobreposto ao TSA e as placas foram incubadas por mais 22 horas a 37°C quando foram efetuadas as contagens das colônias (UFC/mL). Esta metodologia fundamentou-se na técnica proposta por Hartman et al. (1975), adaptada por Kang; Fung (2000). Os meios de cultura MLCB e XLD foram comparados objetivando determinar se havia diferenças nos índices de recuperação de *Salmonella* em manga cv. Tommy Atkins.

2.3. Análise estatística – Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias, quando significativas ($p < 0,05$), foram comparadas utilizando-se teste de Tukey a 95% de probabilidade. Utilizou-se o programa estatístico SAS (*Statistical Analysis System* – SAS Institute Inc., North Carolina, USA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A concentração final de células no *pool* cultivado foi de aproximadamente 10⁸UFC/mL.

O método do Fragmento do Fruto recuperou melhor as células microbianas inoculadas na manga, como observado na Tabela 1. Essa diferença foi estatisticamente significativa a 95% de confiança sendo,

portanto, o método escolhido para prosseguimento das análises. Em estudos utilizando melão Beuchat; Scouten (2004) obtiveram boa recuperação utilizando o Fragmento do Fruto na determinação de *Salmonella entérica* sorotipo Poona.

Tabela 1. Comparação entre métodos Fragmento do Fruto e *Swab* para recuperação de *Salmonella* em manga.

Método	Inóculo*	Recuperação*
Fragmento do Fruto	7,92	5,42±0,17 ^a
<i>Swab</i>		4,92±0,13 ^b

*Logaritmo (UFC/mL)
Média e desvio padrão de cinco repetições

A detecção de micro-organismos patogênicos é um aspecto importante no controle da segurança dos alimentos. Um método ideal deve detectar micro-organismos normais e injuriados (WU, FUNG, 2006). Uma célula injuriada é definida como aquela que sobreviveu a um estresse, porém, perdeu algumas de suas qualidades distintivas. Este estresse normalmente é atribuído à manipulação e aos processos que o alimento é submetido, tais como frio, calor, uso de substâncias conservadoras, sanitizantes, irradiação, micro-ondas, entre outros (JAY et al., 2005).

Na comparação entre os métodos de Semeadura em Superfície e o de Duas Camadas de Ágar, notou-se que este último apresentou melhor resultado. A diferença foi estatisticamente significativa a 95% de confiança (Tabela 2), possivelmente indicando que as células de *Salmonella* estavam injuriadas e que a presença de um meio de cultura não seletivo auxiliou no revigoramento destas.

É de conhecimento que meios de cultura seletivos possuem o potencial de diferenciar os micro-organismos alvo, porém estes podem não permitir o crescimento de células injuriadas. Salienta-se a publicação de vários estudos que objetivam mitigar a presença de células injuriadas, melhorando, desta maneira, as técnicas de recuperação de micro-organismos (HARTMAN et al. 1975; RAY 1993; CLAVERO, BEUCHAT, 1995; KANG, SIRAGUSA, 1999; WU, FUNG, 2001).

Tabela 2. Comparação entre métodos de Semeadura em Superfície (SS) e Duas Camadas de Agar (DCA) para recuperação de *Salmonella* em manga.

Método	Inóculo*	Recuperação*
Semeadura em Superfície	7,24	5,79±0,26 ^b
Duas Camadas de Agar		6,28±0,21 ^a

*Logaritmo (UFC/mL)
Média e desvio padrão de cinco repetições

Após a escolha do melhor método de semeadura, avaliou-se qual meio de cultura apresentava melhor recuperação da *Salmonella* na manga.

Os meios de cultura utilizados no presente estudo, XLD e MLCB, são recomendados pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (Brasil, 2003) para pesquisar *Salmonella*. O meio MLCB apresentou os melhores resultados (Tabela 3), em relação ao meio XLD, essa diferença foi significativa estatisticamente a 95% de confiança.

Tabela 3. Comparação entre meios MLCB e XLD na recuperação de *Salmonella* em manga.

Meios	Inóculo*	Recuperação*
MLCB	7,24	6,28±0,21a
XLD		5,64±0,12b

*Logaritmo (UFC/mL)
Média e desvio padrão de cinco repetições

Em estudos comparando os meios Agar verde brilhante e XLD Albuquerque et al. (2000) observaram que ambos apresentaram eficiência semelhante na detecção de *Salmonella* em rações para animais. Já Nye et al. (2002), avaliaram o desempenho de ágar, dentre eles XLD e MLCB como meio de plaqueamento direto para o isolamento de *Salmonella* enterica, os autores constataram que o meio de cultura MLCB deu a maior taxa de isolamento individual (84,8%) e células bacterianas contaminantes não afetaram o reconhecimento de colônias de *Salmonella*, os autores ainda concluíram que para *Salmonella* não-typhi, MLCB é o melhor meio de cultivo para plaqueamento direto.

4. CONCLUSÕES

Com base nos resultados apresentados, é lícito concluir que o procedimento Fragmento do Fruto foi mais eficiente que o método do *Swab*, que o método que utilizou duas camadas de ágar apresentou melhores resultados de contagem que o método utilizando apenas meio de cultura seletivo e o meio MLCB

demonstrou melhor eficiência que o XLD, indicando que essa metodologia, nas condições aqui apresentadas, pode ser eficiente na recuperação de *Salmonella* inoculados em mangas cv. Tommy Atkins, no estágio de maturação 2.

5. AGRADECIMENTOS

À FAPESP pelo apoio financeiro a essa pesquisa (Processo 10/08065-6) e ao CNPq pela bolsa de doutorado.

6. REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, R.; ITO, N. M. K.; MIYAJI, C. I. Estudo comparativo de diferentes meios de cultura para o isolamento de salmonelas em matérias-primas e rações. **Rev. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.** vol.37 n.1 São Paulo, 2000.

ASSIS, J. S. D. Colheita e pós-colheita. In: MOUCO, M.A.C. (Ed.). **Cultivo da Mangueira**. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, Sistemas de Produção, 2. Versão eletrônica, 2004.

BEUCHAT, L. R.; SCOUTEN, A.J. Factors affecting survival, growth, and retrieval of *Salmonella* Poona on intact and wounded cantaloupe rind and in stem scar tissue. **Food Microbiology**, p. 683–694, 2004.

BRACKETT, R.E. Incidence, contributing factors, and control of bacterial pathogens in produce. **Postharvest Biology and technology**, v.15, p. 305-311, 1999.

BORDINI, M.E.B.; RISTORI, C.A.; JAKABI, M.; GELLI, D.S.. Incidence, internalization and behavior of *Salmonella* in mangoes, var. Tommy Atkins. **Food Control**, v.18, p.1002–1007, 2007.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Instrução Normativa IN nº 62, de 26 de agosto de 2003**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em 21 de agosto de 2015.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2013. Disponível em: <http://www.cdc.gov/foodborneburden/PDFs/pathogens-complete-list-01-12.pdf> Acesso em 20 de Março de 2015.

CLAVERO, M.R.S.; BEUCHAT, L.R. Suitability of selective plating media for recovering heat- or freeze-stressed *Escherichia coli* O157:H7 from tryptic soy broth and ground beef. **Appl. Environ. Microbiol.** 61, 3268–3273, 1995.

DEERING, A. J.; MAUER, L.J.; PRUITT, R. E. Internalization of *E. coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. in plants: A review. **Food Research International**. Volume 45, Issue 2, March 2012, Pages 567–575

HARTMAN, P.A., HARTMAN, P.S., LANZ, W.W. Violet red bile 2 agar for stressed coliforms. **Appl. Microbiol.** 29, 537–539, 1975.

JAY, J.M., LOESSNER, M.J., GOLDEN, D.A. **Modern Food Microbiology**. Springer, New York, NY, p. 229–233, 2005.

KANG, D.H., FUNG, D.Y.C. Application of thin agar layer method for recovery of injured *Salmonella* Typhimurium. **Int. J. Food Microbiol.** 54, 127–132, 2000.

KANG, D.H. SIRAGUSA, G.R. Agar underlay method for recovery of sub lethally heat-injured bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.** 65, 5334–337, 1999.

NYE, K.J.; FALLON, D.; FRODSHAM, D.; GEE, B.; GRAHAM, C.; HOWE, S.; MESSER, S.; TURNER, T.; WARREN, R.E. Uma avaliação do desempenho dos ágaros XLD, DCA, MLCB, e ABC como mídia plaqueamento direto para o isolamento de *Salmonella* enterica de fezes. **Journal Clinical Pathologic**, Number 4: 286-292. 2002.

PENTEADO, A. L.; EBLEN, B. S.; MILLER, A. J. Evidence of *Salmonella* Internalization into Fresh Mangos during Simulated Postharvest Insect Disinfestation Procedures. **Journal of Food Protection**, Number 1, January 2004; p. 181-184.

RAY, B. Sub lethal injury, bacteriocins, and food microbiology. **ASM News**, 59, 285–291, 1993.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM-SAS. **User's procedures guide**. Version 6.04, Cary: SAS Institute, 1999.

STRAWN, L.K.; DANYLUK, M.D. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. on fresh and frozen cut mangoes and papayas. **International Journal of Food Microbiology** 138 (2010) p. 78–84.

TAUXE, R.V. Emerging Foodborne Diseases: an involving public health challenge. **Emerging Infectious Disease.**, Atlanta, v.3, n.4, p. 425-434. 1997.

WU, V.C.H.; FUNG, D.Y.C. Simultaneous recovery and detection of four heat injured foodborne pathogens in ground beef and milk by a four-compartment thin agar layer plate. **J. Food Safety**. 26, 126–136, 2006.

WU, V.C.H. AND FUNG, D.Y.C. Evaluation of thin agar layer method for recovery of heat-injured foodborne pathogens. **J. Food Sci.** 66, 580–583, 2001.