

Isolamento de *Enterobacter cowanii* em tomates após irradiação gama

M.C.V. Vicalvi¹; E.G. Solidônio¹; M.A. Silva¹; G.R. da Silva²; K.X.F.R de Sena²; W. Colaço¹

¹Programa de Pós Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife-Pe, Brasil

²Laboratório de Antibióticos –CCB/UFPE
claudiavicalvi@hotmail.com

(Recebido em 29 de março de 2013; aceito em 15 de julho de 2013)

O tomate é um dos frutos mais consumidos no mundo. Bactérias da família *Enterobacteriaceae* são responsáveis pelos grandes surtos de gastroenterites. A irradiação consiste num método físico que reduz as perdas eliminando organismos deteriorantes de alimentos. Diante disto, o objetivo deste trabalho foi identificar e determinar o perfil de resistência de bactérias da família *Enterobacteriaceae* a partir de tomates irradiados. Para isto, utilizaram-se três lotes contendo 80 tomates, divididos em controle e irradiados. As amostras foram embaladas e devidamente identificadas quanto à dose de irradiação aplicada. O material foi irradiado em fonte de cobalto-60 (6,060 kGy/h) com doses de 1,0; 1,5 e 2 kGy. Para a análise microbiológica os tomates foram cortados, sendo retiradas as cascas a fim de obter amostras pesando 25g. Cada amostra foi transferida a um Erlenmeyer contendo água esterilizada, o conjunto foi agitado mecanicamente. Alíquotas das águas de lavagem foram semeadas em meios seletivos e diferenciais. Após reisolamento, as colônias foram submetidas ao método de coloração de Gram, em seguida realizados os testes bioquímicos para identificação clássica. As provas de susceptibilidade a antibióticos foram realizadas segundo o CLSI (Clinical Laboratory Standard Institute). Foram isoladas três cepas de *Enterobacter cowanii* nas amostras de tomate irradiados com 1,0 kGy, não havendo presença de isolados nos tomates submetidos às demais doses. Quanto ao perfil de resistência, as linhagens identificadas foram resistentes à Ampicilina. A irradiação gama na dose de 1,5 e 2 kGy em tomates foi eficiente como também o micro-organismo isolado após irradiação não apresentou perfil de multiresistência.

Palavras-chave: Irradiação, *Enterobacter cowanii*, Perfil de resistência

Isolation of *Enterobacter cowanii* in tomatoes after gamma irradiation

The tomato is one of the most consumed fruit in the world. Bacteria of the family *Enterobacteriaceae* are responsible for large outbreaks of gastroenteritis. Irradiation is a physical method which reduces waste by eliminating spoilage organisms in foods. The objective of this study was to identify and determine the resistance profile of micro-organisms of the family *Enterobacteriaceae* from irradiated tomatoes. Were used three batches each containing 80 tomatoes, and divided in control and irradiated. The samples were individually properly identified as the irradiation dose applied. The material was subjected to irradiation with gamma rays, for irradiating with a cobalt-60 source, using doses: 1.0, 1.5 and 2 kGy (6,060 kGy/h). For microbiological analysis tomatoes were cut out, and removing the shells to obtain samples weighing 25g. Each sample was transferred to an Erlenmeyer containing sterilized water, stirring the assembly mechanically. Aliquots of the wash waters were sown in differential and selective media. After reisolation, the colonies were subjected to Gram staining then performed biochemical tests for identification. The antibiotic susceptibility tests were performed according to CLSI (Clinical Laboratory Standard Institute). It was isolated three strains of *Enterobacter cowanii* in tomato samples irradiated with a dose of 1.0 kGy, without isolating the other doses. As for the resistance profile, the strains were resistant to Ampicillin identified. Gamma irradiation at a dose of 1.5 and 2 kGy was effective in tomatoes as well as the micro-organism isolated after irradiation showed no profile of multidrug resistance.

Keywords: Irradiation, *Enterobacter cowanii*, resistance profile

1. INTRODUÇÃO

O tomate é um dos frutos mais consumidos e plantados, não só no Brasil, como em todo mundo ¹. Este fruto está entre os produtos agrícolas recordistas em perdas, em razão da sua elevada perecibilidade. Sua contaminação dá-se desde o período pré-colheita até o pós-colheita. Os estudos referentes à conservação pós-colheita de tomates são escassos por isso, nesta etapa, ainda não foram definidas as tecnologias e o tempo de vida útil para os diferentes cultivares desse fruto ^{2,3,4,5,6}.

A produção industrial brasileira de tomates teve início no século XX. Todavia, a cultura do tomate teve grande impulso apenas na década de 50, no Estado de São Paulo, o que viabilizou a implantação de diversas agroindústrias. Na década de 80, a expansão alcançou o Nordeste, especialmente Pernambuco e o norte da Bahia. Nessas regiões o cultivo do tomate foi favorecido face às condições climáticas existentes durante a maior parte do ano. Porém, a partir de 1991, ocorreu uma redução da área plantada, provocada pela maior oferta de polpa no mercado internacional e pelo ataque severo da traça-do-tomateiro, cientificamente chamada de *Tuta absoluta* ⁷. Segundo a EMBRAPA, em 2010 foram cultivados no Brasil cerca de 18 mil hectares de tomateiros rasteiros, cuja produção é toda destinada à indústria, com uma produção anual em torno de 1.284 toneladas, concentradas principalmente na região dos cerrados do centro-oeste e também no oeste de São Paulo, onde são cultivados cerca de quatro mil hectares ¹.

Apesar da evolução tecnológica das últimas décadas, quanto às técnicas de conservação e higiene dos alimentos, as doenças por eles transmitidas têm sido consideradas um grave problema de saúde pública em escala mundial ⁸. A microbiota dos vegetais frescos é originária principalmente do solo, das formas de cultivo (convencional ou hidropônica), da água de irrigação, do ar, dos insetos e animais silvestres. É representada basicamente pelas espécies da família *Enterobacteriaceae*, que são responsáveis por grandes surtos de gastroenterites nos seres humanos ⁹.

Os métodos de preservação dos alimentos empregam processos físicos ou químicos. Dentre tais métodos, a irradiação de alimentos consiste num método preventivo de segurança alimentar. Com o descobrimento e desenvolvimento de técnicas utilizando material radioativo, muitos setores foram beneficiados. Um deles foi o setor alimentício que através do emprego das radiações ionizantes conseguiu obter resultados, que podem amenizar e até mesmo evitar uma série de problemas, quanto às enfermidades de origem alimentar ¹⁰.

A irradiação pode reduzir as perdas do pós-colheita matando pragas de insetos em frutas, grãos, ou temperos, reduzindo organismos deteriorantes de alimentos, inibindo o brotamento de vegetais e retardando o amadurecimento de frutas ¹¹.

O processo de irradiação pode ser usado como uma medida de saúde pública de intervenção para o controle de doenças de origem alimentar ^{12,13}. Isto é extremamente importante uma vez que nas últimas duas décadas, doenças de etiologia microbiana tornaram-se um problema crescente de saúde pública em todo o mundo ¹⁴.

Desta forma, o trabalho teve como objetivo identificar e determinar o perfil de resistência das bactérias da família *Enterobacteriaceae* em tomates irradiados.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Seleção das amostras

Foram utilizados três lotes de tomates maduros, íntegros, sem danos à casca ou interior, comercializados em diferentes boxes na feira-livre do CEAGEPE (Companhia de Armazéns Gerais do Estado de Pernambuco), Recife-PE. Cada lote foi composto por oitenta frutos, divididos em quatro grupos (controle e as doses de 1,0; 1,5 e 2,0 kGy). Cada ensaio foi realizado em triplicata.

2.2 Análise microbiológica

O procedimento experimental foi composto por duas séries de análises microbiológicas. A primeira foi feita com as amostras do produto *in natura* e a segunda com amostras do produto após a irradiação. Os tomates foram assepticamente acondicionados em embalagens fechadas e conduzidos até o laboratório de Fármacos e Ensaio Antimicrobianos no Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco.

2.3 Isolamento e identificação de Enterobactérias

Em um frasco contendo 225 mL de água destilada esterilizada foram adicionados 25g da casca da fruta que correspondem em média a cinco tomates. O conjunto foi agitado mecanicamente por 15 minutos¹⁵. Após o período de agitação, alíquotas da água de lavagem foram retiradas com alça de platina calibrada (1µL) e semeadas utilizando a técnica de esgotamento em triplicata nos meios: Ágar Sangue de Carneiro, Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB), Ágar entérico de Hektoen (HE), Ágar Salmonella-Shigella (SS) e Ágar Manitol. As placas foram incubadas a 35° C por 24 horas. Após incubação, as colônias foram reisoladas para posterior identificação¹⁶. Todo o ensaio foi realizado em triplicata, para as amostras do grupo controle e irradiadas.

2.4 Identificação dos isolados

Após reisolamento, as colônias foram submetidas à técnica de coloração de Gram para separação dos micro-organismos em Gram-positivos e Gram-negativos, e observação da morfologia. As colônias características que se apresentaram Gram-negativas e na forma de bacilos foram submetidas aos seguintes testes bioquímicos para identificação: Teste de utilização fermentativa da glicose, lactose e sacarose (meio TSI); Teste de motilidade, avaliação da produção de Indol e produção de H₂S (meio SIM); produção de Urease (caldo uréia de Stuart); e teste de utilização de Citrato de Sódio ou Citrato de Simmons e prova da utilização de carboidratos^{16,17}.

2.5 Análise do perfil de sensibilidade dos micro-organismos identificados frente a diferentes antibióticos

Para o teste de susceptibilidade antimicrobiana das colônias isoladas a partir das amostras do grupo controle e das irradiadas foi utilizado o procedimento adotado pelo CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)¹⁸, que consiste em transferir três a cinco colônias de cada micro-organismo identificado de uma cultura de 16 a 18 horas a 35 °C, para um tubo com 5 mL de água esterilizada. Após a turvação da solução a um valor correspondente ao tubo 0,5 de turbidez da Escala de McFarland ($\pm 10^8$ UFC), a suspensão foi semeada, utilizando-se “swab” esterilizado embebido em solução em placa contendo o Ágar Müller Hinton em três sentidos diferentes, girando-se a placa num ângulo de 60° após cada aplicação. Os discos de antibióticos foram colocados sobre a superfície do meio semeado assepticamente, obedecendo a uma distância mínima de 15 mm. Para as enterobactérias os antibióticos utilizados foram: Ampicilina (10µg), Cefalotina (30µg), Cefoxitina (30µg), Cefotaxima (30µg), Cefepime (30µg), Gentamicina (10µg), Tetraciclina (30µg), Ciprofloxacina (5µg), Amoxicilina + Ác. Clavulânico (20/10µg) e para os *Staphylococcus* spp.: Ciprofloxacina, Clindamicina, Cloranfenicol, Eritromicina, Gentamicina, Linezolida, Oxacilina, Tetraciclina e Penicilina. As placas assim preparadas foram incubadas a 35 ± 2 °C. Após um período de 16 a 18 horas de incubação, as placas foram examinadas e os diâmetros das zonas de inibição foram medidos e classificados de acordo com a Tabela M100/S20 do CLSI.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram isoladas três cepas de *Enterobacter cowanii* nas amostras de tomate irradiados somente na dose de 1,0 kGy, que nos testes bioquímicos apresentaram produção de H₂S negativa, citrato positivo, ureia negativa e TSI (Agar Triple Sugar Iron) ácido/ácido (Figura 1). Para as doses de 1,5 e 2 kGy, a irradiação foi eficiente e por isso não houve isolamento de cepas.

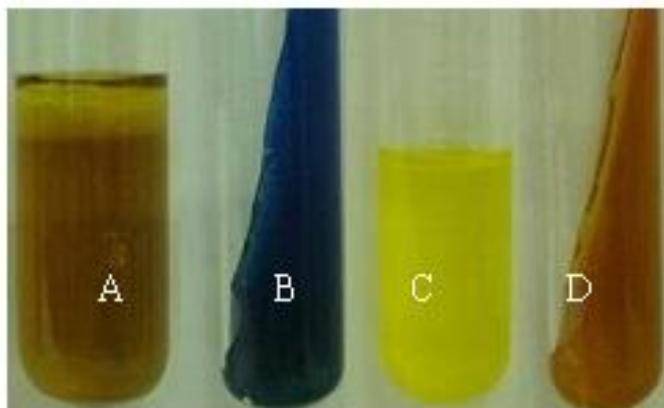


Figura 1: Testes bioquímicos para identificação de *Enterobacter cowanii*: A. produção de H₂S negativa; B. Citrato positivo C. Uréia D.TSI ácido/ácido.

Dussault et al. ¹⁹, em trabalho com cenouras, encontraram *Pantoea agglomerans* após o uso da radiação com doses de 1 e de 3-5 kGy. Avaliaram também o efeito da irradiação- γ sobre os ácidos graxos e muropéptídeos de duas cepas de *Pantoea agglomerans* e concluíram que os efeitos da irradiação na membrana bacteriana são notados, e que poderiam desempenhar um papel importante na resposta celular e na capacidade de sobrevivência desse micro-organismo nesse ambiente rígido.

Solidônio ²⁰, avaliando amostras de camomila irradiadas com a dose de 5 kGy, observou a presença de *Serratia ficaria*, *Pantoea agglomerans* e *Pseudomonas aeruginosas*. Assim como no presente estudo houve isolamento de membros da família *Enterobacteriaceae* após irradiação, representados pelas espécies dos gêneros *Serratia* e *Pantoea*.

Das 94 cepas de *Staphylococcus* (coagulase positiva e negativa), isoladas em *Jerked Beef*, 24% ou 22 cepas foram isoladas após o uso da radiação nas doses de 2, 4 e 6 kGy ²¹, resultados diferentes dos encontrados neste trabalho.

Quanto ao perfil de resistência aos antibióticos, as linhagens identificadas se apresentaram resistentes apenas à Ampicilina (Figura 2).

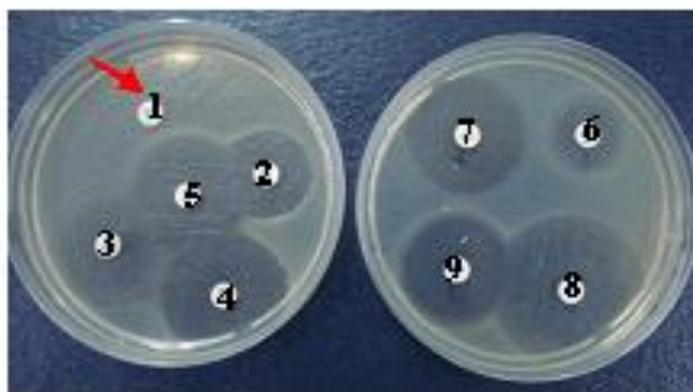


Figura 2- Resistência de *Enterobacter cowanii* à Ampicilina como indicado na seta vermelha. 1. ampicilina, 2. cefalotina, 3. cefoxitina, 4. cefotaxima, 5. cefepime, 6. gentamicina, 7. ciprofloxacina, 8. tetraciclina, 9. amoxicilina+ácido clavulânico.

O uso indiscriminado de antibióticos em várias práticas, incluindo as práticas médicas, veterinárias e agrícolas, resultam em uma pressão seletiva sobre as bactérias, contribuindo para a seleção de micro-organismos com os padrões de resistência aos antibióticos. A presença de bactérias resistentes aos antibióticos tem sido descrita em diversos ambientes, incluindo solos, em águas superficiais e de consumo e em alimentos, representando um problema crescente de saúde pública²².

Tais fatores poderiam justificar a presença de micro-organismos resistentes verificada nos tomates analisados. Neste trabalho, não foi estabelecida uma relação entre as doses de radiação utilizadas e o perfil de resistência à antibióticos nos micro-organismos estudados.

4. CONCLUSÃO

A irradiação gama na dose de 1,5 e 2 kGy em tomates foi eficiente. Nas amostras de tomate irradiadas com 1 kGy, as cepas de *Enterobacter cowanii* não apresentaram perfil de multirresistência. Assim, o processo de irradiação pode ser usado como uma medida de saúde pública de intervenção para o controle de doenças de origem alimentar.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq pela bolsa de mestrado concedida.

-
1. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa). Hortaliças. Sistema de Produção - 2ª Edição. Versão eletrônica dez 2006. Disponível em: <www.cnph.embrapa.br> acesso em 20 de janeiro de 2010.
 2. Kluge, R.A.; Rodrigues, D.S.; Minami, K. Aquecimento intermitente em tomates: efeito sobre danos de "chilling". Horticultura Brasileira, Brasília, volume 14, n.1, p.91,. Resumo. maio 1996.
 3. Luengo, R.F.; Moita, A.W.; Nascimento, E.F.; Melo, M.F. Redução de perdas pós-colheita em tomate de mesa acondicionado em três diferentes embalagens. Horticultura Brasileira, Brasília, volume 19, n.2, p.151-154, julho 2001.
 4. Pestana, V. R.; Ferrari, C. S.; Zambiasi, R. C. Elaboração de tomate em calda. In: XVIII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia De alimentos, 18., Porto Alegre, Anais. Porto Alegre: Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia. 2002.
 5. Chitarra, M. I. F.; Chitarra, A. B. Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio. 2ed. Lavras: UFLA, 783p. 2005.
 6. Ferreira, S. M. R.; Freitas, R. J. S. de. Tomate de mesa: origem, taxonomia e variedades. R. Higiene Alimentar, São Paulo: volume 19, n. 135, p. 34– 39, set. 2005.
 7. Jaime, S. B., et. al. Estabilidade do molho de tomate em diferentes embalagens de consumo. Revista Ciênc. Tecnol. Aliment. volume 18 , n. 2 Campinas Maio/Julho 1998
 8. Oliveira, A. De M.; Gonçalves, M. O.; Shinohara, N. K. S.; Stamford, T. L. M. Manipuladores de Alimentos: um fator de risco. Revista Higiene Alimentar, volume 17, n. 114/115, p. 12-18, Nov./dez 2003.
 9. Sant'ana, A., Azeredo, D. P.; Costa, M.; Macedo, V. Análise de perigos no processamento mínimo de vegetais. Revista Higiene Alimentar, São Paulo, volume 16, n. 101, p. 80-84, out. 2002.
 10. Rocha, M. A. A.; Souza Q. H. F. Irradiação de alimentos: Uso de alimentos irradiados no tratamento de pacientes com baixa imunidade. Brasília, setembro de 2007. Disponível em: <<http://www.crrt01.org.br/html/pdf/irradiacao.pdf>>. Acesso em 22 março 2011.
 11. Hackwood, S. An introduction to the irradiation processing of foods. In: Home, S. Food Irradiation, Elsevier Applied Science Series, London. 1991.
 12. Thayer, D.W. Food Irradiation: Benefits and Concerns. Journal of Food Quality, 13:147-169.1990.
 13. Paho. Final Report. Joint FAO/IAJGI/PAHO/WHO Technical Consultation on Irradiation as a Public Health Intervention Measure for Food-Borne Diseases in Latin America and the Caribbean, Washington, DC, USA, 19-21 October.1992.
 14. Diehl, J. F.; E.S.Josephson. Assessment of Wholesomeness of Irradiated Foods. A Review. Acta Alimentaria, 23(2): 195-214.1994.

15. Cabrini, K. T., Siviero, A. R.; Honorio, E. F.; Oliveira, L. F. C.; Venâncio, P. C. Pesquisa de Coliformes Totais e Escherichia coli e Alfaces (*Lactuca sativa*) comercializadas na cidade de Limeira, São Paulo, Brasil. Revista Higiene Alimentar, volume 16, n. 95, abril 2002.
16. Koneman, E. W.; Allen, S. D.; Dowell, V. R. et al. Diagnóstico Microbiológico. 3ª Edição, D. F.: Ed. Médica Panamericana S.A.1465p. 2008.
17. Santos Filho, Lauro. Manual de Microbiologia Clínica. 3ª edição, João Pessoa: Editora Universitária, 2003. 341p.
18. Clinical And Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement. CLSI document M100-S20. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2010.
19. Dussault, D.; Caillet, S.; Le Tien, C.; Lacroix, M. Effect of γ -irradiation on membrane fatty acids and peptidoglycan's mucopeptides of *Pantoea agglomerans*, a plant pathogen. Journal of Applied Microbiology, volume 106, n.3, p. 1033-1040, 2009.
20. Solidônio, E.G. Avaliação Microbiológica de Materiais de Camomila (*Matricaria Recutita L.*) irradiados, empregados na produção de chás. Dissertação (Mestrado). CTG- Universidade Federal de Pernambuco. 2009.
21. Silva, M.A. Efeitos da irradiação gama na descontaminação do *Jerked beff* comercializado em Recife-Pe. Dissertação (Mestrado). CTG- Universidade Federal de Pernambuco. 2011.
22. Zamora, J.M.;Chaves, C.; Arías, M.L. Comparación del perfil de sensibilidad a antibióticos de cepas de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp. aisladas a partir de alimentos con cepas de origen clínico. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. Volume 56. n. 2 Caracas jun. 2006.