

## Diversidade e resistência a antibióticos de bactérias psicrotróficas isoladas de tanques coletivos de resfriamento de leite

Diversity of psychotrophic bacteria isolated from the milk cooling collective tanks and antibiotics resistance profile of the microorganisms isolates

RIALA6/1520

Simone Cristina MARQUES<sup>1\*</sup>, Suzana Reis EVANGELISTA<sup>1</sup>, Roberta Hilsdorf PICCOLI<sup>2</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Laboratório de Microbiologia, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras/UFLA, Campus da UFLA, s/n, CP 3037, Lavras, MG, Brasil, CEP: 37200-000. E-mail: scmarques85@gmail.com

<sup>2</sup>Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras  
Recebido: 08.03.2012 – Aceito para publicação: 01.11.2012

### RESUMO

Bactérias psicrotróficas isoladas da parede, do fundo e da pá de homogeneização de tanques coletivos de resfriamento de leite, após o processo de higienização, foram identificadas e caracterizadas quanto à capacidade de produzir lipase, lecitinase e protease, bem como determinada a sensibilidade dos isolados a antibióticos. Foram coletadas amostras de 32 tanques coletivos, localizados em diferentes cidades no sul do estado de Minas Gerais, por meio de *swab* de amostra da superfície, e analisadas pelas técnicas de diluições seriadas com plaqueamento em ágar tripton de soja e incubação das placas a 7 °C por 10 dias. As bactérias isoladas foram identificadas bioquimicamente pelos *kits* API 20NE (Biomérieux-Brasil) e Bactray I e II (Laborclin-Brasil). Foram identificados 197 isolados, os quais foram caracterizados quanto à produção de lipase, lecitinase e protease. Para efetuar o teste de resistência a antibióticos, 21 isolados foram selecionados. Contagens entre  $< 1$  e  $10^8$  UFC/cm<sup>2</sup> foram observadas, com prevalência de *Serratia* sp., *Klebsiella* sp. e espécies do gênero *Pseudomonas* sp. Os isolados identificados apresentaram elevada atividade proteolítica e lipolítica, e a atividade de lecitinase foi menos pronunciada. A multidroga resistência foi detectada em 54% dos isolados analisados.

**Palavras-chave.** bactérias psicrotróficas, resistência a antibióticos, protease, lipase.

### ABSTRACT

Psychotrophic bacteria were isolated from the wall, bottom and homogenization spade of cooling milk collective tank, after performing the hygienic procedure. These isolates were identified and characterized on the ability in producing protease, lipase and lecithinases, and also to determine the isolates susceptibility to antimicrobial agents. From 32 collective tanks, located in different cities in the South of Minas Gerais, the samples from their surface were collected by swab technique, which were analyzed by serial dilutions plated on trypticase soy agar and incubated at 7 °C for 10 days. Then, the isolates were selected for performing biochemical identification using kits API 20NE (Biomérieux-Brazil) and Bactray I and II (Laborclin-Brazil). One hundred ninety-seven isolates were identified and characterized in relation to protease, lipase and lecithinase production. From these isolates, 21 were selected for testing the resistance to antibiotics. Bacterial countings from  $< 1$  to  $10^8$ CFU/cm<sup>2</sup> were detected, with the prevalence of *Serratia* sp., *Klebsiella* sp., besides some species of *Pseudomonas* genus. The identified isolates showed high proteolytic and lipolytic activity, although the lecithinase activity was less evident. The multidrug resistance was observed in 54% of isolates analyzed.

**Keywords.** psychotrophic bacteria, antibiotic resistance, protease, lipase.

## INTRODUÇÃO

A higienização de equipamentos, superfícies e utensílios utilizados no armazenamento ou processamento de alimentos tem por objetivo a remoção de micro-organismos e sujidades, uma vez que falhas nesse processo favorecem a adesão microbiana e formação de biofilme<sup>1,2</sup>.

A formação do biofilme envolve a produção e liberação de substâncias poliméricas extracelulares (SPE) ou exopolissacarídeo, levando à formação de uma matriz que favorece a fixação dos micro-organismos<sup>3,4</sup>. Nesse ambiente, as células aderidas tornam-se mais resistentes a agentes químicos, em função da barreira física formada por essa matriz. A resistência é relatada em quinhentas<sup>1</sup> ou mil vezes<sup>5</sup> quando comparada a células livres ou planctônicas<sup>6,7</sup>.

A adesão bacteriana está associada também ao aumento significativo da resistência a muitos agentes antibióticos<sup>8-11</sup>. Além disso, o biofilme serve como proteção para diversas mudanças ambientais como exposição à radiação ultravioleta<sup>12</sup> ou a ácidos<sup>13</sup>, além de dissecação.

A problemática do biofilme em tanques de resfriamento de leite está na contínua liberação de células aderidas para o alimento, fato observado nos trabalhos realizados por Caixeta et al.<sup>14</sup> e Boari et al.<sup>15</sup>. O destacamento de células, como é chamada essa liberação, é importante para minimizar a escassez de nutrientes devido ao aumento de células na superfície e permite a colonização de novos ambientes. Esse fenômeno acontece como uma resposta genética ou como um estímulo físico no contato líquido-superfície<sup>16,17</sup>.

Esse destacamento torna-se importante foco de contaminação do leite e muitas vezes de contaminação por bactérias resistentes a antibióticos, uma vez que a formação de um biofilme pode favorecer a aquisição de elementos genéticos móveis (plasmídeos, transposons e integrons) contendo genes de resistência a antimicrobianos ou genes que codificam estruturas e/ou mecanismos que impeçam a ação do antibiótico<sup>18,19</sup>. Termos como corresistência, *cross*-resistência e resistência pleitrópica têm sido usados na literatura científica como referência aos fenótipos de resistência a multidroga na tentativa de diferenciar a forma de aquisição da resistência pela bactéria a uma ou diferentes classes de antibióticos<sup>20</sup>.

Para classificar a resistência bacteriana, diferentes denominações têm sido discutidas<sup>20</sup>. Um dos métodos usados por alguns autores e autoridades (*Center for Disease Control and Prevention* – CDC e *European*

*Center for Disease Prevention and Control* – ECDC) para caracterizar organismos como *multi-drug resistant* ou multidroga resistente é a resistência a três ou mais classes de antimicrobianos<sup>21,22</sup>.

Em 2010, após diversas discussões, o ECDC apresentou a proposta final de criação das definições *multi-drug resistant* (MDR), *extreme drug resistant* (XDR) e *pandrug resistant* (PDR) como forma de padronizar a terminologia internacional para definir bactérias que são resistentes a um número significativo de antibióticos<sup>23</sup>. Foram criadas categorias de antimicrobianos baseadas na tabela de antibióticos citados no *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI)<sup>24</sup>, antibióticos foram incluídos ou excluídos baseados em recomendações das diretrizes do *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST)<sup>25</sup>, além da utilização de outros critérios de exclusão e inclusão.

Para essas definições serem válidas, dentre outras questões, devem ser testados todos ou quase todos os agentes dentro das categorias listadas nas diretrizes do CLSI<sup>24</sup> ou do EUCAST<sup>25</sup>.

Bactérias psicrotróficas apresentam capacidade de crescimento em temperaturas em torno de 7 °C, independente de sua temperatura ótima de crescimento. Podem ser bactérias gram-positivas, como *Staphylococcus aureus*, ou gram-negativas, com predominância de *Pseudomonas*, *Serratia*, *Aeromonas*, dentre outras, e, além da resistência a antibióticos, apresentam a capacidade de produzir diversas exoenzimas termorresistentes, lipases e proteases, responsáveis por grandes perdas econômicas do leite<sup>26</sup>. Tais enzimas são secretadas no final da fase log de crescimento em densidades populacionais iguais ou superiores a 10<sup>6</sup> UFC/mL<sup>26</sup>.

A termorresistência dessas enzimas dá-se pela capacidade de reorganização da estrutura terciária, danificada durante a pasteurização, tornando-as ativas, sendo assim capazes de deteriorar os alimentos<sup>27</sup>. Lipases hidrolisam a gordura do leite promovendo a liberação de ácidos graxos de cadeia curta, com produção de sabor e odores desagradáveis no leite, e proteases degradam caseína causando cor cinzenta, sabor amargo, além de geleificação de produtos submetidos à esterilização por ultra-alta temperatura (UAT)<sup>26,28</sup>.

Pelo exposto, esta pesquisa foi conduzida com os objetivos de isolar, identificar e caracterizar, quanto à capacidade de produzir lipases, lecitinases e proteases, bactérias psicrotróficas isoladas da parede, fundo e pá de homogeneização de tanques coletivos de resfriamento

de leite, após etapa de higienização, e determinar a sensibilidade a antibióticos dos isolados identificados.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Coleta das amostras e enumeração bacteriana

Foram amostrados 32 tanques coletivos de resfriamento de leite localizados no sul do estado de Minas Gerais.

Empregando-se a técnica de esfregaço em superfície com *suabe*, foram amostrados 100 cm<sup>2</sup> das áreas de parede, fundo e pá de homogeneização de tanques coletivos de resfriamento de leite, após higienização manual. O processo de higienização envolveu as etapas de limpeza, com remoção de resíduos orgânicos e minerais com auxílio de soluções detergentes, e a etapa de sanitização, com aplicação de sanitizante à base de cloro.

Seguinte ao esfregaço, os *suabes* foram imersos em tubos contendo água peptonada 0,1% e transportados para o laboratório em caixas isotérmicas. Procedeu-se a homogeneização das amostras por vigorosa agitação por 10 minutos, sendo realizadas diluições seriadas e plaqueamento na superfície do meio ágar triptona de soja. Foram realizadas triplicatas de cada diluição. Após incubação a 7 °C por 10 dias, realizou-se a contagem de colônias, seleção dos morfotipos e armazenamento dos isolados.

### Identificação fenotípica dos isolados

A pureza dos isolados foi monitorada por coloração de Gram; aqueles caracterizados como gram-negativos foram submetidos aos testes de oxidase e prova de oxidação-fermentação (OF), segundo metodologia descrita por Garrity e Holt<sup>29</sup>. Bactérias gram-negativas e oxidase-negativas foram identificadas utilizando-se os kits de identificação Bactray I e II (Laborclin®), e bactérias gram-negativas e oxidase-positivas identificadas utilizando o API 20 NE (Biomérieux®).

### Teste qualitativo para protease, lipase e lecitinase

Para determinação da produção de enzimas, os isolados foram cultivados em caldo triptona de soja a 28 °C por 24 h, e a determinação da protease, lipase e lecitinase seguiu metodologia descrita por Frank et al.<sup>30</sup>.

A protease foi determinada em ágar leite, suplementado com 5% de leite em pó desnatado, sendo as placas incubadas a 28 °C por até 72 h.

A atividade lipolítica foi determinada em ágar tributirina suplementado com 2% de tributirina mais solução de azul de o-toluidina a 1%, sendo as placas incubadas a 28 °C por até 72 h.

A produção de lecitinase foi determinada em meio ágar triptose de soja suplementado com 10% de emulsão de gema de ovo. As placas foram incubadas a 28 °C por 48 h.

Nos três testes, a presença de uma zona opaca ao redor das colônias foi indicativa da produção da enzima pela bactéria.

### Resistência bacteriana a antibióticos

Baseado em recomendações prévias do CLSI<sup>24</sup>, os seguintes antibióticos foram utilizados: tetraciclina 30 µg/disco, norfloxacin 10 µg/disco, cefuroxima 30 µg/disco, ampicilina 10 µg/disco, estreptomicina 10 µg/disco, cloranfenicol 30 µg/disco, pelo método de difusão em ágar Mueller Hinton, segundo Bauer et al.<sup>31</sup>. Foram selecionados 21 isolados dentre os 197 identificados cujo percentual nas amostras foi intermediário ou elevado.

Após incubação das placas a 28 °C por 24 h, temperatura sugerida como ótima para o crescimento de bactérias psicrotróficas, os halos foram mensurados e os valores expressos em milímetros. O isolado foi identificado como resistente ou sensível ao antibiótico testado, segundo o CLSI<sup>24</sup>.

## RESULTADOS

Os resultados das contagens de micro-organismos psicrotróficos em tanques coletivos de resfriamento de leite são apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Contagem de bactérias psicrotróficas isoladas da parede, fundo e pá de homogeneização de leite, de 32 tanques coletivos de resfriamento de leite localizados no sul de Minas Gerais

Contagem (UFC/cm <sup>2</sup> )	Parede (n/N)	Fundo (n/N)	Pá (n/N)
<1	19/32	18/32	11/32
8,5x10 <sup>3</sup> a 9,3x10 <sup>4</sup>	6/32	9/32	4/32
5x10 <sup>5</sup> a 4,3x10 <sup>8</sup>	7/32	5/32	17/32

n: número de amostras detectadas; N: número total de amostras analisadas.

Foram detectadas bactérias psicrotróficas nos locais amostrados nos tanques coletivos, com contagens entre < 1 UFC/cm<sup>2</sup> e 4,3 x 10<sup>8</sup> UFC/cm<sup>2</sup>, sendo que

contagens mais elevadas, ordem de  $10^8$  UFC/cm<sup>2</sup>, foram detectadas na pá de homogeneização do leite em dezessete dos trinta e dois tanques analisados.

A diversidade dos isolados identificados pode ser verificada na Tabela 2.

Nesta pesquisa foram caracterizados 197 isolados como bactérias gram-negativas, sendo 56 identificados pelo kit de identificação bioquímica API 20NE, e os demais 141 isolados identificados pelo Bactray I e II. Foi detectada ampla diversidade bacteriana entre os isolados, com detecção de bactérias com potencial patogênico, como *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, bem como de micro-organismos deteriorantes, como *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia liquefaciens*, dentre outros.

Quanto à atividade enzimática, a Figura 1 mostra os percentuais detectados da atividade proteolítica, lipolítica e da lecitinase entre os isolados.

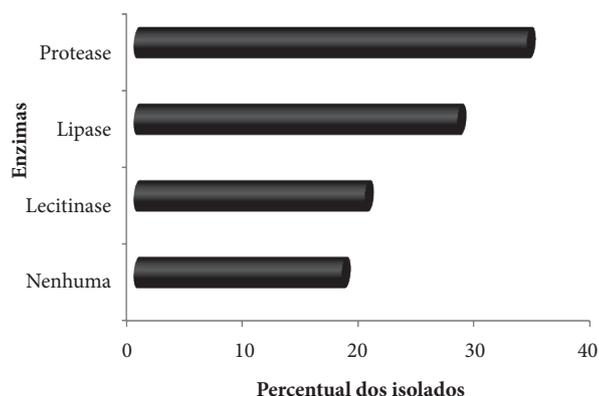
**Tabela 2.** Frequência e percentual de bactérias isoladas e identificadas a partir dos 3 pontos de amostragem (parede, fundo e pá de homogeneização) de tanques de resfriamento de leite coletivos

Bactéria	Nº de isolados	% de ocorrência
<i>Aeromonas hydrophila</i>	13	6,59
Complexo <i>Burkholderia cepacia</i>	37	18,78
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	0,51
<i>Enterobacter cloacae</i>	3	1,53
<i>Enterobacter sakasaki</i>	1	0,51
<i>Hafnia alvei</i>	27	13,69
<i>Klebsiella oxytoca</i>	5	2,55
<i>Klebsiella ozaenae</i>	35	17,76
<i>Moraxella</i> sp.	1	0,51
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3	1,53
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	11	5,58
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	2	1,02
<i>Serratia liquefaciens</i>	33	16,74
<i>Serratia odorifera</i>	3	1,53
<i>Shigella flexneri</i>	17	8,62
<i>Yersinia enterocolitica</i>	5	2,55
<b>Total</b>	<b>197</b>	<b>100%</b>

**Tabela 3.** Diâmetro do halo da sensibilidade ou resistência a antibióticos de bactérias psicrotróficas, identificadas a partir de tanques de resfriamento de leite coletivos, após higienização, localizados no sul de Minas Gerais

Bactéria	Antibiótico e Categoria					
	Diâmetro do halo (mm)					
	Tetraciclina <sup>1</sup>	Norfloxacina <sup>2</sup>	Cefuroxima <sup>3</sup>	Ampicilina <sup>4</sup>	Estreptomicina <sup>5</sup>	Cloranfenicol <sup>6</sup>
<i>Serratia liquefaciens</i>	S (22 mm)	S (17 mm)	R (2 mm)	R (11mm)	S (22 mm)	S (24 mm)
<i>S. liquefaciens</i>	R (10 mm)	I (16 mm)	R (2 mm)	R (11mm)	R (2 mm)	R (2 mm)
<i>S. liquefaciens</i>	S (21 mm)	S (18 mm)	R (12 mm)	R (2 mm)	S (17 mm)	R (8 mm)
<i>S. liquefaciens</i>	S (23 mm)	S (17 mm)	R (8 mm)	R (11 mm)	S (16 mm)	R (8 mm)
<i>S. liquefaciens</i>	S (23 mm)	S (17 mm)	R (2 mm)	R (10 mm)	R (2 mm)	R (2 mm)
<i>S. liquefaciens</i>	S (15 mm)	S (17 mm)	S (18 mm)	R (11 mm)	R (6 mm)	R (8 mm)
<i>S. liquefaciens</i>	S (15 mm)	S (17 mm)	S (18 mm)	S (19 mm)	S (15 mm)	R (2 mm)
<i>S. liquefaciens</i>	R (11 mm)	S (23 mm)	S (18 mm)	R (9 mm)	S (15 mm)	S (21 mm)
<i>Serratia plymuthica</i>	S (24 mm)	I (16 mm)	R (9 mm)	R (2 mm)	S (19 mm)	S (21 mm)
<i>Shigella flexneri</i>	S (24 mm)	S (17 mm)	R (9 mm)	R (2 mm)	S (15 mm)	R (8 mm)
<i>S. flexneri</i>	S (23 mm)	S (14 mm)	R (10 mm)	R (9 mm)	S (17 mm)	R (11 mm)
<i>S. flexneri</i>	R (11 mm)	R (10 mm)	R (10 mm)	R (2 mm)	R (10 mm)	S (19 mm)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	S (19 mm)	S (14 mm)	R (13 mm)	R (2 mm)	S (15 mm)	R (11 mm)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	S (23 mm)	S (19 mm)	S (18 mm)	S (19 mm)	S (18 mm)	S (18 mm)
<i>Enterobacter cloacae</i>	S (17 mm)	S (17 mm)	S (23 mm)	S (20 mm)	S (16 mm)	S (18 mm)
<i>E. cloacae</i>	S (23 mm)	S (30 mm)	S (20 mm)	S (17 mm)	S (18 mm)	S (19 mm)
<i>Yersinia enterocolitica</i>	S (21 mm)	S (21 mm)	R (2 mm)	R (2 mm)	S (17 mm)	S (18 mm)
<i>Hafnia alvei</i>	S (18 mm)	S (17 mm)	R (10 mm)	R (13 mm)	R (6 mm)	S (20 mm)
<i>H. alvei</i>	S (17 mm)	S (18 mm)	R (12 mm)	R (9 mm)	S (17 mm)	R (11 mm)
<i>H. alvei</i>	R (10 mm)	R (12 mm)	R (11 mm)	S (18 mm)	R (5 mm)	R (9 mm)
<i>H. alvei</i>	S (21 mm)	S (19 mm)	S (23 mm)	R (13 mm)	S (17 mm)	S (25 mm)

Legenda: 1 = categoria: tetraciclina; 2 = categoria: fluoroquinolonas; 3 = categoria: cefens; 4 = categoria: penicilinas; 5 = categoria: aminoglicosídeos; 6 = categoria: fenicol. S = Sensível; I = Intermediário; R = Resistente.



**Figura 1.** Distribuição do percentual de isolados com atividade proteolítica, lipolítica, lecitinase e que não apresentaram atividade enzimática, identificados a partir da parede, fundo e pá de homogeneização de tanques coletivos de resfriamento de leite

Variação no percentual de atividade das enzimas proteolíticas foi observada nesta pesquisa, visto que 34% dos 197 isolados apresentaram atividade proteolítica, 28% atividade lipolítica e 20% apresentaram atividade de lecitinase, sendo que em 18% não foi detectada a atividade das enzimas analisadas.

O percentual de resistência aos antibióticos testados dos 21 isolados de bactérias psicrotróficas submetidos ao antibiograma estão demonstrados na Tabela 3.

A resistência a três ou mais classes de antibióticos foi observada em 54% dos isolados analisados, podendo ser caracterizados como multidroga resistentes.

## DISCUSSÃO

A *American Public Health Association* (APHA)<sup>32</sup> recomenda, para equipamentos e utensílios de indústrias de processamento de alimentos, contagem máxima de 2 UFC/cm<sup>2</sup> para aeróbios mesófilos, enquanto as Organizações Pan-americanas de Saúde (OPAS) e Mundial de Saúde (OMS)<sup>2</sup>, preconizam contagens de até 50 UFC/cm<sup>2</sup>. Considerando esse padrão para outros grupos de micro-organismos, como os psicrotróficos analisados neste trabalho, falhas na higienização da parede de 13 tanques foram detectadas, sendo que na amostragem do fundo 14 tanques apresentaram valores acima dos padrões.

Vale ressaltar que as contagens obtidas na pá de homogeneização de 66% (21) dos tanques analisados estavam acima do valor estabelecido pela APHA e OMS, e em 17 desses tanques contagem na ordem de 10<sup>5</sup> a 10<sup>8</sup> UFC/cm<sup>2</sup> foram detectadas, indicando provável formação de biofilme nessa área.

Dessa maneira, equipamentos de processamento e armazenamento de alimentos devem possuir um *design* higiênico, como presença de superfícies lisas, ausência de cantos ou bordas de difícil acesso, e ser de fácil desmontagem, principalmente se tratando de limpeza manual como a realizada nos tanques analisados. Um plano eficaz de higienização deve ser montado, dando-se atenção especial aos locais de difícil limpeza, como a pá de homogeneização de tanques de resfriamento de leite, uma vez que a presença de matéria orgânica e a formação de incrustações favorecerão a formação de biofilme.

Valores inferiores aos desta pesquisa foram observados por Carvalho et al.<sup>33</sup>, observando a adesão de *Pseudomonas* sp. em tanques de estocagem de leite, com contagens de 8,4 x 10<sup>1</sup> UFC/cm<sup>2</sup>.

A presença de *Pseudomonas* sp. tem sido observada por diversos autores como Adams et al.<sup>34</sup>, constatando que de 70% a 90% dos psicrotróficos isolados de leite cru estocados a 4°C, por uma semana, eram *Pseudomonas*. Já Eneroth et al.<sup>35</sup> observaram maior frequência de isolamento de espécies de *Pseudomonas* (72% a 77%) em amostras de leite cru, de leite pasteurizado e de amostras ambientais de indústrias de laticínios. A presença desse gênero pode ser explicada pelo fato de algumas espécies apresentarem um tempo de geração curto em temperaturas entre 0 °C e 7 °C<sup>28</sup>, limiar de temperatura ao qual o leite fica submetido quando armazenado em tanques de resfriamento.

Além de *Pseudomonas* sp., elevada foi a incidência de *Shigella* sp., *Klebsiella* sp., *Escherichia coli*, além de outras enterobacteriaceae, o que pode ser justificada pela proximidade dos tanques de resfriamento do estábulo, uma vez que tais bactérias foram identificadas em mosca de estábulo (*Stomoxys calcitrans* Linnaeus, 1758) por Moraes et al.<sup>36</sup>.

Bactérias psicrotróficas, como as do complexo *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia liquefaciens*, detectadas neste trabalho, podem ser provenientes de água, solo, vegetação e úbere<sup>37</sup>. Santana et al.<sup>38</sup> demonstraram que as principais fontes de bactérias psicrotróficas são tetos, equipamentos e tubulações mal higienizados, além da presença de água residual nos equipamentos, sendo que esses autores detectaram em água residual de tanques de resfriamento contagens na ordem de 10<sup>7</sup> UFC/mL.

Diversas espécies pertencentes ao gênero *Pseudomonas*, que se multiplicam em temperaturas de refrigeração, produzem enzimas hidrolíticas como

proteases, que terão como alvo a caseína e lipases que hidrolisam a gordura<sup>26</sup>, afetando dessa maneira a qualidade do leite e promovendo redução da vida útil de derivados lácteos. O percentual de isolados que apresentaram atividade proteolítica foi de 34%, sendo que a lipolítica de 28%, ao passo 20% apresentaram atividade da enzima lecitinase e 18% não demonstraram atividade enzimática. Percentual superior foi obtido por Dogan e Boor<sup>39</sup> ao evidenciarem que 69% dos 338 isolados identificados de *P. fluorescens* isoladas de leite cru apresentaram atividade proteolítica e de lecitinase, enquanto apenas 14,5% dos isolados de *P. putida* produziram essas enzimas hidrolíticas.

Outro problema ocasionado pela adesão de psicrotróficos em tanques de resfriamento está na capacidade de biotransferência das células bacterianas para o leite, fato observado por alguns autores<sup>16</sup>. Essas células, podendo conter genes de resistência a antibióticos, serão liberadas e contaminarão o leite.

A classificação dos isolados como multidrogas resistente pôde ser feita com base no número de classes a qual determinado isolado foi resistente, não sendo possível indicá-los como XDR ou PDR. Para essas definições serem válidas, devem-se testar todos ou quase todos antibióticos dentro das categorias listadas nas diretrizes do EUCAST<sup>25</sup> ou do CLSI<sup>24</sup>, o que não foi realizado neste trabalho. O que se pode inferir é que a resistência tende a ser elevada em ambientes nos quais o uso de drogas é intenso e constante<sup>23</sup>.

O armazenamento do leite em tanques deficientemente higienizados poderá gerar redução de sua vida útil ou de derivados produzidos a partir de leite contaminado por bactérias psicrotróficas, uma vez que são produtoras de enzimas termoestáveis. Além disso, o leite poderá agir como veiculador de bactérias resistentes a antibióticos.

## CONCLUSÃO

Observou-se neste trabalho que falhas no processo de higienização acarretaram adesão bacteriana na parede, fundo e pá de homogeneização de tanques de resfriamento de leite, pela detecção de elevadas contagens. O isolamento e a identificação de bactérias psicrotróficas, a partir da técnica do *suabe*, demonstrou uma diversidade entre os isolados e, com a determinação da atividade enzimática, a qualidade do leite poderá ser reduzida quando tais bactérias entrarem em contato com

o leite. Aliado à redução da vida útil está o fato de que o leite poderá veicular bactérias resistentes a antibióticos, resistência observada em 54% dos isolados analisados.

---

## AGRADECIMENTOS

A autora é beneficiária de auxílio financeiro da CAPES-Brasil.

---

## REFERÊNCIAS

1. Costerton W, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korke DR, Lappin Scott HM. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol*. 1995;49(1):711-45.
2. De Andrade NJ. Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos. São Paulo (SP): Varela; 2008.
3. Kumar CG, Anand SK. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *Int J Food Microbiol*. 1998;42(1-2):9-27.
4. Sutehrland IW. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiol*. 2001;147(1):3-9.
5. Drenkard E. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Review. Microbes Infect*. 2003;5(13):1213-9.
6. Burmølle M, Webb JS, Rao D, Hansen LH, Sørensen SJ, Kjelleberg S. Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms. *Appl Environ Microbiol*. 2006;72 (6):3916-23.
7. Marques SC, Rezende JGOS, Alves LAF, Silva BC, Alves E, Abreu LR, et al. Formation of biofilms by *Staphylococcus aureus* on stainless steel and glass surfaces and its resistance to some selected chemical sanitizers. *Braz. J. Microbiol*. 2007;38(3):538-43.
8. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*. 2002;15(2):167-93.
9. Prince AS. Biofilms, antimicrobial resistance, and airway infection. *New Engl. J. Med*. 2002;347(14):1110-1.
10. Douglas LJ. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol*. 2003;11(1):30-6.
11. Stewart PS, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Biofilm antimicrobial resistance. In: Ghannoum MA, O'Toole GA, editors. *Microbial Biofilms*. Washington (DC): American Society for Microbiology; 2004.
12. Bernbom N, Vogel BF, Gram L. *Listeria monocytogenes* survival of UV-C radiation is enhanced by presence of sodium chloride, organic food material and by bacterial biofilm formation. *Int J Food Microbiol*. 2011;147(1):69-73.
13. McNeill K, Hamilton IR. Acid tolerance response of biofilm cells of *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiol Lett*. 2003;221(1):25-30.
14. Caixeta DS, Scarpa TH, Brugnera DF, Freire DO, Alves E, Abreu LR, et al. Chemical sanitizers to control biofilms formed by two *Pseudomonas* species on stainless steel surface. *Ciênc Tecnol Alim*. 2012(1):142-50.
15. Boari CA, Alves MP, Tebaldi VMR, Savian TV, Piccoli RH. Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas*

- hydrophila* e *Staphylococcus aureus* usando leite e diferentes condições de cultivo. *Ciênc Tecnol Alim*: 2009;29(4):886-95.
16. Herrera JJR, Cabo ML, González A, Pazos I, Pastoriza L. Adhesion and detachment kinetics of several strains of *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* under three different experimental conditions. *Food Microbiol*. 2007;24(6):585-91.
  17. Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol*. 2004;(2):95-108.
  18. Teale CJ. Antibiotic resistance and the food chain. *J Appl Microbiol. Symposium Suppl*. 2002;92(1):85-9.
  19. Salisbury JG, Nicholls TJ, Lammerding AM, Turnidge J, Nunn M. A risk analysis framework for the long-term management of antibiotic resistance in food-producing animals. *Int J Antimicrob Agents*. 2002;20(3):153-64.
  20. Cantón R, Garbajosa-Ruiz P. Co-resistance: an opportunity for the bacteria and resistance genes. *Curr Opin Pharmacol*. 2011;(5):477-85.
  21. Gould IM. The epidemiology of antibiotic resistance. *Int J Antimicrob Agents*. 2008;32 Suppl 1:2-9.
  22. Kallen AJ, Hidron AI, Patel J, Srinivasan A. Multidrug resistance among gram-negative pathogens that caused healthcare-associated infections reported to the national healthcare safety network, 2006-2008. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2010;31(5):528-31.
  23. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18(3):268-81.
  24. Clinical and Laboratory Standards Institute (Pensilvânia – EUA) – CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty first informational suppl. M100-S21. 2011;30(1):1-142.
  25. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – EUCAST. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 2.0. 1º jan 2012.
  26. Sorhaug T, Stepaniak L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects. *Trends Food Sci Technol*. 1997;8(2):35-41.
  27. Braun P, Sutherland JP. Predictive modelling of growth and measurement of enzymatic synthesis and activity by a cocktail of selected Enterobacteriaceae and *Aeromonas hydrophila*. *Int J Food Microbiol*. 2005;105(2):257-66.
  28. Law BA, Andrews AT, Sharpe ME. Gelation of UHT sterilized milk by proteases from a strain of *Pseudomonas fluorescens*, isolated from raw milk. *J Dairy Res*. 1977;44:145-8.
  29. Garrity GM, Holt JG. The road map to the Manual. In: Boone DR, Castenholz RW. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. New York, Berlin: Springer-Verlag; 2001. p. 119-66.
  30. Frank JF, Christen GL, Bullerman LB. Tests for groups of microorganisms. In: Marshall RT. *Standard methods for the examination of dairy products*. Washington: American Public Health Association; 2005. p. 271-86.
  31. Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol*. 1996;45(4):493-6.
  32. Sveum WH, Moberg LJ, Rude RA, Frank JF. Microbiological monitoring of the food processing environment. In: Vanderzant C, Splittstoesser DF. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. Washington (DC): APHA; 1992. p. 51-74.
  33. Carvalho AF, Silva ID, Careli RT, Morell NA, Andrade NJ. Adesão de *Pseudomonas* spp em tanques de estocagem de leite cru refrigerado granelizado na microrregião de Viçosa/MG. In: Congresso Brasileiro de qualidade do leite. Goiânia, 2006.
  34. Adams DM, Barach IT, Spec ML. Heat resistant proteases produced in milk by psychrotrophic bacteria of dairy origin. *J Dairy Sci*. 1975;58 (6):828-35.
  35. Eneroth A, Christiansson A, Brendehaug J, Molin G. Critical contamination sites in the production line of pasteurised milk, with reference to the psychrotrophic spoilage flora. *Int Dairy J*. 1998;8(9):829-34.
  36. Moraes APR, Badini PV, Souza MMS, Bittencour AJ. Avaliação da capacidade de *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus, 1758) em carrear bactérias envolvidas nas etiologias das mastites de municípios do Rio de Janeiro. *Rev Bras Parasitol Vet*. 2004;13(4):143-9.
  37. El-Sukhon SN. Identification and characterization of *Klebsiella* isolated from milk and milk products. *Food Microbiol*. 2003;20(2):225-30.
  38. Santana EHW, Beloti V, Barros MAF, Moraes LB, Gusmão VVT, Pereira MS. Contaminação do leite em diferentes pontos do processo de produção: I Microrganismos aeróbios mesófilos e psicrotóxicos. *Semina: Ciências Agrárias*. 2001;22(2):145-54.
  39. Dogan B, Boor KJ. Genetic diversity and spoilage potentials among *Pseudomonas* spp. isolated from fluid milk products and dairy processing plants. *Appl Environ Microbiol*. 2003;69(1):130-8.