

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE
BACTÉRIAS PSICROTRÓFICAS DE
TANQUES DE REFRIGERAÇÃO DE LEITE E
FORMAÇÃO DE BIOFILME POR
Pseudomonas fluorescens E *Staphylococcus aureus*
EM AÇO INOXIDÁVEL**

SIMONE CRISTINA MARQUES

2008

SIMONE CRISTINA MARQUES

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE
BACTÉRIAS PSICROTRÓFICAS DE TANQUES
DE REFRIGERAÇÃO DE LEITE E FORMAÇÃO
DE BIOFILME POR *Pseudomonas fluorescens* E
Staphylococcus aureus EM AÇO INOXIDÁVEL**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de “Doutor”.

Orientadora
Prof.^ª. Dr.^ª. Roberta Hilsdorf Piccoli

**LAVRAS
MINAS GERAIS-BRASIL
2008**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Marques, Simone Cristina.

Caracterização bioquímica de bactérias psicrotróficas de tanques de refrigeração de leite e formação de biofilme por *Pseudomonas fluorescens* e *Staphylococcus aureus* em aço inoxidável. / Simone Cristina Marques. -- Lavras : UFLA, 2008.

58 p. : il.

Tese (Doutorado) Universidade Federal de Lavras. 2008

Orientador: Roberta Hilsdorf Piccoli.

Tese (Doutorado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Bactérias psicrotróficas. 2. Enzimas hidrolíticas. 3. Homoserina lactona acilada. 4. Biofilme. 5. *Serratia liquefaciens*. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 589.95

SIMONE CRISTINA MARQUES

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE BACTÉRIAS
PSICOTRÓFICAS DE TANQUES DE REFRIGERAÇÃO DE
LEITE E FORMAÇÃO DE BIOFILME POR *Pseudomonas
fluorescens* E *Staphylococcus aureus* EM AÇO INOXIDÁVEL**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras
como parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação *Stricto Sensu* em Ciência dos Alimentos,
para a obtenção do título de “Doutor”.

Prof. Drº. Eduardo Alves	DFP/UFLA
Prof. Drº. Geraldo Márcio Costa	DMV/UFLA
Prof. Drº. Alexandre Tourino Mendonça	UNINCOR
Profª. Drª. Cristiane Gattini Sbampato	UNINCOR

Profa. Drª. Roberta Hilsdorf Piccoli
UFLA
(Orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS-BRASIL

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu guia.

À minha adorável mãe e meu querido pai, por serem a luz da minha vida, pelo apoio e carinho incondicionais.

Ao meu namorado, Enrico, pelas palavras iluminadas nos momentos de cansaço e pela acolhida nos momentos difíceis, e à sua família pelo incentivo e carinho.

Às minhas irmãs, Patrícia, Cláudia, Raquel e Danielle, pelo apoio, carinho e amor.

Aos meus anjinhos, Gabriella, Rafaella, João Vitor e Vinícius, fontes de luz.

À minha amiga, conselheira e orientadora Roberta Hilsdorf Piccoli, pela amizade e apoio incondicionais. Agradeço pela acolhida e realização deste sonho.

Às minhas amigas Cristiane, Patrícia, Danila e Gisele pelo carinho e apoio.

A todos os professores do programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos.

À Prof^a Patrícia Gomes Cardoso, pelo auxílio e carinho.

À Eliane e “Seu Piano”, agradeço pela amizade e convivência nestes 8 anos de jornada.

A todos os colegas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Danila, Cleube, Thales, Dayane, Victor, Nélio, Danilo, Maíra, Carolina, Rosilene, Alessandra, Bibiane, Eliza, Mariana e Gisele pelo apoio, amizade e bate-papo.

Aos estagiários que passaram pelo laboratório Dayane Silva, Luciana, Wellinton e João, obrigada pelo auxílio. Em especial, agradeço à Suzana e ao Dieyckson que tanto me auxiliaram na condução do experimento; obrigada pela amizade.

Aos funcionários do Departamento de Ciência dos Alimentos/UFLA: Sandra,

Tina, Creuza, Lucilene, Thalita, Sarah e “Seu Miguel” por todos os esclarecimentos.

À equipe do CEAD/UFLA, Lucivane, Cleide, Flávia, Sarah, Patrícia Andrade, Profº Luis Roberto Batista e alunos da turma I/2008 do CQA, obrigada pelo voto de confiança.

À FAPEMIG, pelo apoio financeiro na realização deste projeto.

À Professora Maria Cristina Dantas Vanetti e à Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia Agrotecnologia, pela doação das cepas.

A todos que participaram desta pesquisa.

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT.....	iii
CAPÍTULO 1	1
1 Resumo	3
2 Abstract	4
3 Introdução	5
4 Material e Métodos	8
4.1 Coleta de amostras e realização das análises microbiológicas	8
4.2 Produção de enzimas extracelulares	8
4.3 Resistência bacteriana a antibióticos	9
5 Resultados e Discussão	10
6 Conclusão	20
7 Referências Bibliográficas	21
CAPÍTULO 2	25
1 Resumo	27
2 Abstract	28
3 Introdução	29
4 Material e Métodos	32
5 Resultados e Discussão	33
6 Conclusão	35
7 Referências Bibliográficas	36
CAPÍTULO 3	39
1 Resumo.....	41
2 Abstract	42
3 Introdução	43

4 Material e Métodos	46
5 Resultados e Discussão	49
6 Conclusão	54
7 Referências Bibliográficas	55
CONCLUSÕES GERAIS	58

RESUMO GERAL

MARQUES, Simone Cristina **Caracterização bioquímica de bactérias psicotróficas de tanques de refrigeração de leite e formação de biofilme por *Pseudomonas fluorescens* e *Staphylococcus aureus* em aço inoxidável** 2008. 58 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos)-Universidade Federal de Lavras, MG.¹

Bactérias psicotróficas multiplicam-se no leite cru quando armazenado sob temperatura de refrigeração por períodos prolongados. Dentre as fontes de contaminação destacam-se as falhas nos procedimentos de higienização de superfícies e equipamentos, como tanques de resfriamento de leite, que favoreceram a adesão e formação de biofilme por bactérias psicotróficas, que apresentam como característica relevante na deterioração de alimentos pela produção de enzimas hidrolíticas termorresistentes (proteases, lípases e lecitinase). A expressão das enzimas hidrolíticas além da formação de biofilme e resistência a agentes antimicrobianos é controlada pelo sistema de autoindução ou *quorum sensing* que, em bactérias Gram-negativas como *Pseudomonas fluorescens* e *Serratia liquefaciens* é regulado pela homoserina lactona acilada (AHL) sendo que, em bactérias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus* essa regulação ocorre pela síntese de peptídeos. Pelas observações relatadas objetivou-se com esta pesquisa: isolar, identificar e caracterizar, quanto à capacidade de produzir enzimas hidrolíticas, bactérias psicotróficas de tanques coletivos de resfriamento de leite; determinar a susceptibilidade dos isolados identificados a agentes antimicrobianos; detectar a produção de homoserina lactona acilada em estirpes de *S. liquefaciens* e *P. fluorescens* e avaliar a formação de biofilme em aço inoxidável por *S. aureus* e *P. fluorescens* em condições de monocultivo e cultivo combinado e determinar a atividade proteolítica das células aderidas. Foram amostrados por meio de *swabs* estéreis 100 cm² do fundo, 100 cm² da parede e 100 cm² da pá de homogeneização de tanques, seguido de diluições seriadas e plaqueamento em agar tripton de soja (TSA), com incubação a 7^o/7-10 dias, em seguida os isolados foram submetidos a testes bioquímicos utilizando-se kits de identificação: Bactray I e II e API20NE. Para determinação da atividade das enzimas hidrolíticas utilizou-se o teste de difusão em agar. Em seguida, foram selecionadas 2 isolados de *P. fluorescens* e 6 isolados de *S. liquefaciens* para avaliar a produção de AHL, utilizando *Agrobacterium tumefaciens* A136 como estirpe monitora. Os isolados foram estriados paralelos a estirpe monitora em placa contendo agar lúria-bertani suplementado com 50 ug/mL de X-Gal e incubados a 28°C/24 horas. A formação de biofilme por *S. aureus* e *P. fluorescens* foi avaliada sob condições

de monocultivo e cultivo combinado, além da determinação da atividade proteolítica das células aderidas. Foi observada grande diversidade bacteriana entre os isolados com predominância de *Pseudomonas* sp. dentre aqueles identificados pelo API20NE e de *Serratia* sp. dentre as bactérias identificadas pelo Bactray I e II, a atividade proteolítica foi mais pronunciada entre todos os isolados, seguida da atividade lipolítica e da lecitinase. A multirresistência aos antibióticos testados foi observada em 100% dos isolados. A produção da molécula sinalizadora foi observada em todas os isolados. Houve formação de biofilme no monocultivo e cultivo combinado por *P. fluorescens* e *S. aureus*, sendo que, nas duas condições *S. aureus* apenas aderiu à superfície de aço inoxidável. A atividade proteolítica foi detectada com mais intensidade em *P. fluorescens* sendo dependente da alta densidade celular indicando a importância do sistema de *quorum sensing* em bactérias psicotróficas.

Palavras-chaves: bactérias psicotróficas, enzimas hidrolíticas, homoserina lactona acilada, biofilme, *Staphylococcus aureus*, *Serratia liquefaciens*.

¹Orientadora: Roberta Hilsdorf Piccoli – DCA/UFLA.

GENERAL ABSTRACT

MARQUES, Simone Cristina. **Biochemical characterization of psychrotrophic bacteria of milk-cooling tanks and formation of biofilm by *Pseudomonas fluorescens* and *Staphylococcus aureus* on stainless steel.** Lavras: UFLA, 2008. 58 p. (Thesis – Doctorate in Food Science).

Psychrotrophic bacteria multiply in raw milk when stored under cooling temperature for prolonged periods. Out of the sources of contamination, failures in the procedures of surface and equipment hygienization such as milk freezing tanks, which support both the adhesion and formation of biofilms by psychrotrophic bacteria, which present as a relevant characteristic in food decaying by the production of hydrolytic heat-resistant enzymes (proteases, lipases and lecithinase)). The expression of the hydrolytic enzymes in addition to the formation of biofilm and resistance to antimicrobial agents is controlled by the self-induction system or quorum sensing which in Gram-negative bacteria such as *Pseudomonas fluorescens* and *Serratia liquefaciens* is regulated by acylated homoserine lactone (AHL) and in Gram-positive bacteria such as *Staphylococcus aureus*, that regulation occurs by peptide synthesis. From the observations reported, it was intended by this research work: isolating, identifying and characterizing as to the capacity of producing hydrolytic enzymes, psychrotrophic bacteria of collective tanks for milk freezing; determining the susceptibility of the identified isolates to antimicrobial agents; detecting the production of acylated homoserine lactone in strains of *S. liquefaciens* and *P. fluorescens*; evaluating the formation of biofilms on stainless steel by *S. aureus* and *P. fluorescens* under conditions of monoculture and combined culture and determining the proteolytic activity of the adhered cells. 100 cm² of the bottom, 100 cm² of the wall and 100m² of the homogenizing paddle of tanks were sampled by means of sterile swabs, followed of serial dilutions and plating on tryptose soy agar (TSA) with an incubation at 7°C/ 7-10 days, next, the isolates were submitted to biochemical tests by utilizing identification kits: Bactray I and II and API20NE. For determination of the activity of hydrolytic enzymes, the agar diffusion test was utilized. Next, 2 isolates of *P. fluorescens* and 6 isolates of *S. liquefaciens* were chosen to evaluate AHL production by utilizing *Agrobacterium tumefaciens* A136 as a monitor strain. The isolates were streaked parallel to the monitor strain on a dish containing luria-bertani agar supplemented with 50 ug/mL of X-Gal and incubated at 28°C/24 hours. The formation of biofilm by *S. aureus* and *P. fluorescens* was evaluated under conditions of monoculture and combined culture, in addition to the determination of the proteolytic activity of eh adhered

cells. A great bacterial diversity was found among the isolates with predominance of *Pseudomonas* sp. out of those identified by API20NE and of *Serratia* sp out of the bacteria identified by BacTray I and II. The proteolytic activity was more marked among all the isolates, followed by the lipolytic and lecithinase activity. The multiresistance to the antibiotics tested was observed in 100% of the isolates. The production of signaling molecule was found in all the isolates. There was formation of biofilm in the monocultivation and combined cultivation by *P. fluorescens* and *S. aureus*, this is, in the two conditions, *S. aureus* only adhered to the stainless still surface. Proteolytic activity was detected with more intensity in *P. fluorescens*, its being dependent on the high cell density, indicating the importance of the quorum sensing system in psychrotrophic bacteria.

Keywords: psychrotrophic bacteria, hydrolytic enzymes, acylated homoserinelactone, biofilm, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas fluorescens*.

¹Guidance: Roberta Hilsdorf Piccoli – DCA/UFLA.

CAPÍTULO 1

DIVERSIDADE BACTERIANA E RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS DE BACTÉRIAS PSICROTRÓFICAS ISOLADAS DE TANQUES COLETIVOS DE RESFRIAMENTO DE LEITE

**DIVERSIDADE BACTERIANA E RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS DE
BACTÉRIAS PSICROTRÓFICAS ISOLADAS DE TANQUES
COLETIVOS DE RESFRIAMENTO DE LEITE**

Preparado de acordo com as normas da revista *Brazilian Journal of Microbiology*.

Simone Cristina Marques* ; Dayane Silva; Suzana Reis Evangelista; Roberta Hilsdorf Piccoli.

Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil.

*Corresponding Author. Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras. Caixa Postal: 3037. CEP 37200-000. Tel.: 55 35 3829 1656; fax: 55 35 38291391.E-mail address: simone_cm@terra.com.br (Simone Cristina Marques).

1 RESUMO

Esta pesquisa foi conduzida com os objetivos de isolar e identificar bactérias psicrotróficas isoladas de tanques coletivos de resfriamento de leite e caracterizar quanto à sua capacidade de produzir lipase, lecitinase e protease após processo de higienização e detectar a susceptibilidade a agentes antimicrobianos dos isolados identificados. Foram amostrados 100cm² do fundo, 100cm² da parede e 100cm² da pá de homogeneização de 32 tanques coletivos, localizados nas cidades de Aguanil, Campo Belo, Boa Esperança, Candeias, Coqueiral e Nepomuceno. Foram utilizados para as análises *swabs* estéreis e plaqueamento em superfície de ágar tripton de soja (TSA), com incubação a 7°C/10 dias. Após este período, os isolados foram selecionados para identificação bioquímica utilizando-se Kits de identificação API 20NE (Biomérieux-Brasil) e Bactray I e II (Laborclin-Brasil) e caracterizados quanto à produção de lipase, lecitinase e protease. Foram selecionados 33 isolados para serem submetidos ao teste de resistência a antibióticos. Contagens entre < 1 e 10⁸ UFC/cm² foram observadas sendo que, dos 277 isolados identificados, houve maior prevalência do gênero *Pseudomonas* entre os isolados submetidos ao API 20NE e de *Klebsiella ozaenae* entre os isolados identificados pelo Bactray I e II. Os isolados identificados apresentaram elevada atividade proteolítica e lipolítica, sendo que a atividade de lecitinase foi menos pronunciada. A multirresistência aos antibióticos testados foi observada em 100% dos isolados.

Palavras-chave: bactérias psicrotróficas, tanque coletivo, resistência antimicrobiana.

2 ABSTRACT

This research work was conducted with the purposes of isolating and identifying psychrotrophic bacteria isolated from milk –freezing milk and characterizing as to their capacity of producing lipase, lecithinase and protease and detecting their susceptibility to antimicrobial agents of the isolates identified. 100 cm² of the bottom, 100 cm² of the wall and 100 cm² of the homogenizing paddle were sampled of 32 collective tanks situated in the towns of Aguanil, Campo Belo, Boa Esperança, Candeias and Coqueiral and Nepomuceno. Sterile swabs and plating on tryptose soy agar (TSA) with incubation at 7°C/10 days were utilized for the analyses. After that period, the isolates were screened for biochemical identification by utilizing API20NE identification Kits (Bioméricux –Brasil) and Bactray I and II (Laborclin – Brazil) and characterized as to the production of lipase, lecithinase and protease. 33 isolates were screened to be submitted to the antibiotic resistance test. Counts between <1 and 10⁸ CFU/cm² were found, that is, out of the isolates identified, there was increased prevalence of the genus *Pseudomonas* among the isolates submitted to API 20 NE and of *Serratia* sp. identified presented a high proteolytic and lipolytic activity, the activity of lecithinase being less marked. The multiresistance to the tested antibiotics was observed in 100% of the isolates.

Key words: psychrotrophic bacteria, collective tanks, antimicrobial resistance.

3 INTRODUÇÃO

A adoção da estocagem do leite cru em temperaturas de refrigeração reduziu as perdas de leite nas indústrias de laticínios provocadas pela ação de bactérias mesofílicas fermentadoras de lactose. Entretanto, a refrigeração do leite por períodos prolongados favorece o crescimento de microrganismos psicotróficos, sobretudo quando a carga inicial é alta. Em leite obtido sob condições sanitárias adequadas a microbiota psicotrófica representa menos de 10% da microbiota total do leite cru, enquanto este percentual sobe para 75% quando utilizadas condições sanitárias inadequadas (Cousin, 1982; Wiedmann et al., 2000).

As principais fontes de contaminação do leite cru por psicotróficos são a água, o solo, além da superfície do úbere/tetos mal higienizados (Cousin, 1982). Uma fonte secundária de grande importância é a presença de resíduos de leite em utensílios e equipamentos limpos deficientemente por constituírem um nicho de crescimentos para as bactérias, que ali aderem, multiplicam e estabelecem o biofilme (Zotolla & Sasahara, 1994).

Bactérias psicotróficas de inúmeros gêneros têm sido isoladas a partir de leite cru, como as Gram-positivas dos gêneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* e *Lactobacillus* (6, 20) e as bactérias Gram-negativas dos gêneros *Aeromonas*, *Serratia*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Enterobacter*, *Flavobacterium* e *Pseudomonas* (Costerton et al., 1995; Dogan & Boor, 2003; Pinto, et al., 2006; Hantsis-Zacharov & Halpern, 2007). Entre as bactérias Gram-negativas, *Pseudomonas* sp. destaca-se pela frequência de isolamento a partir de leite cru, podendo a contaminação ocorrer devido à sanificação inadequada de superfícies, equipamentos de armazenamento e transporte do leite, além de água e manipuladores (Eneroth et al., 1998; Munsch-Alatossava & Alatossava, 2006).

O crescimento e multiplicação de bactérias psicrotróficas no leite cru promovem a deterioração do leite devido à ação de enzimas extracelulares termorresistentes secretadas pelo microrganismo no final da fase log de crescimento. As proteases e lípases são resistentes à pasteurização (72°C por 15 segundos) assim como ao processamento Ultra Alta Temperatura – UAT (Cousin, 1982); Sorhaug & Stepaniak, 1997). As lipases, pela hidrólise dos triglicerídeos, produzem defeitos em manteiga, queijos e com menor frequência em leite UAT. Uma importante lipase é a lecitinase que rompe a membrana do glóbulo de gordura do leite e expõe a degradação de lipases, resultando em degradações físicas do leite (Santos & Bergmann, 2003; Sorhaug & Stepaniak, 1997). A pasteurização reduz a atividade das lipases, mas não elimina seus efeitos (Koka & Weimer, 2001). As proteases estão associadas a sabor amargo ou pútrido no leite, geleificação de leite esterelizado em ultratemperatura (UAT), além de provocar baixo rendimento na produção de queijo (Santos & Bergmann, 2003; Sorhaug & Stepaniak, 1997). Essas enzimas hidrolizam preferencialmente κ -caseína, seguida da α_{s1} e da β -caseína (Cousin, 1982).

O ecossistema bacteriano existe em diferentes níveis (ambiente, intestino humano, alimentos e biofilme) nos quais rotas simples ou complexas de transferência de genes entre a população bacteriana podem ocorrer. A via mais importante para aquisição de genes de resistência é a transferência de plasmídeos entre bactérias da mesma espécie, filogeneticamente distantes ou com hábitat distinto. Isso pode envolver transferência de resistência a vários antibióticos contribuindo para a prevalência de bactérias com múltipla resistência (Teale, 2002).

A resistência bacteriana a antibióticos se deu pelo aumento do uso de antibióticos na medicina humana e veterinária. Tal resistência pode ocorrer através de genes que codificam estruturas e/ ou mecanismos que impedem a ação do antibiótico, além da aquisição de elementos genéticos móveis

(plasmídeos, transposons e integrons) contendo um gene de resistência para o antibiótico e, ainda, devido a uma mutação envolvendo o gene codificador do alvo do antibiótico (Salisbury et al., 2002). Aproximadamente 50% de todos os agentes antibacterianos usados anualmente nos Estados Unidos são fornecidos a animais.

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, do fundo e da pá de homogeneização do leite de tanques coletivos de resfriamento de leite, depois da etapa de higienização, e determinar a susceptibilidade a agentes antimicrobianos dos isolados identificados.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta das amostras e realização das análises microbiológicas

Foram coletadas 32 amostras de tanques coletivos de resfriamento de leite, sendo 1 tanque localizado na cidade de Aguanil, 2 na cidade de Campo Belo, 19 na cidade de Boa Esperança, 2 em Candeias, 6 em Coqueiral e 2 em Nepomuceno. Foram amostrados 100 cm² da parede, 100 cm² do fundo e 100 cm² da pá de homogeneização do leite, depois do processo de higienização. Foram utilizados para análise *swabs* estéreis e plaqueamento em superfície em ágar tripticase de soja (TSA). Depois de incubação a 7°C por 7 a 10 dias, os isolados foram purificados através de repiques sucessivos e submetidos aos testes de coloração de Gram, catalase, oxidase e prova de oxidação-fermentação (OF). As bactérias caracterizadas como Gram-negativas e oxidase-negativa (Enterobacteriaceae) foram identificadas utilizando os kits de identificação Bactray I e II (Laborclin[®]) e as bactérias caracterizadas como Gram-negativas e oxidase-positiva foram identificadas utilizando o API 20 NE (Biomérieux[®]).

4.2 Produção de enzimas extracelulares

A produção de enzimas extracelulares foi determinada pelo teste de difusão em ágar, conforme metodologia descrita por Munsch-Alatossava & Alatossava (2006). Os isolados foram cultivados em caldo TSB por 24 horas a 28°C. A produção de enzima proteolítica foi determinada em ágar leite, suplementado com 5% de leite em pó desnatado, sendo as placas incubadas 25°C por até 72 h. A presença de zonas claras ao redor das colônias é indicativa de proteólise.

A atividade lipolítica foi determinada em ágar tributirina suplementado com 2% de tributirina e solução de azul de o-toluidina a 1%. As placas foram

incubadas a 25°C por até 72 h. A lipólise foi observada pela formação de zonas claras ao redor das colônias.

A produção de fosfolipase (lecitinase) foi determinada em meio TSA suplementado com 10% de emulsão de gema de ovo; as placas foram incubadas a 25°C por até 48h. A presença de uma zona opaca ao redor das colônias indica a produção da enzima.

4.3 Resistência bacteriana a antibióticos

Os isolados foram submetidos ao antibiograma empregando o método de difusão de discos em ágar Muller-Hinton, segundo metodologia de Kirby-Bauer, para determinar a susceptibilidade aos seguintes antibióticos: tetraciclina 30mcg, novobiocina 30mcg, norfloxacina 10mcg, lincomicina 2mcg, eritromicina 15mcg, cefuroxima 30mcg, estreptomina 10mcg, cloranfenicol 30mcg, ampicilina 10mcg.

Os isolados foram cultivados em caldo TSB a 28°C/ 24 horas depois deste período, estriados em ágar TSA inclinado e incubados a 28°C/24 horas. A suspensão bacteriana foi padronizada segundo a escala 0,5 de Mac Farland e 0,1 mL da suspensão inoculado na superfície do ágar Mueller-Hinton (Biolife, Milão, Itália). Posteriormente, foram adicionados os discos contendo os antibióticos e as placas foram incubadas a 28°C por 24 horas. Depois da incubação os halos foram mensurados e os valores expressos em milímetros, sendo então os microrganismos classificados como resistentes, intermediários e susceptíveis.

Com base nos resultados dos antibiogramas, o índice de resistência a múltiplos antimicrobianos (índice MAR) foi calculado como o número de drogas ao qual determinado isolado foi resistente sobre o número total de drogas utilizadas no trabalho. Segundo Krumperman (1983), um índice MAR acima de 0,2 indica multirresistência.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das contagens de microrganismos 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 nas cidades de Aguanil, Campo Belo, Boa Esperança, Candeias, Coqueiral e Nepomuceno. Valores expressos em UFC/cm².

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

n: número de amostras detectadas

N: número total de amostras analisadas

Foram detectadas bactérias psicrotróficas nos locais amostrados dos tanques coletivos, com contagens entre <1 UFC/cm² e 4,3x10⁸ UFC/cm², sendo que contagens mais elevadas, ordem de 10⁸ UFC/cm², foram observadas na pá de homogeneização do leite.

Valores inferiores aos desta pesquisa foram observados por Carvalho et al. (2006) que observaram a adesão de *Pseudomonas* sp. em tanques de estocagem de leite, com contagens de 1,92 log UFC/cm².

Diversos estudos têm isolado bactérias psicrotróficas de leite cru armazenados em tanques de resfriamento, como em pesquisa realizada por Pinto et al. (2006) que visaram avaliar a qualidade microbiológica de leite cru

refrigerado armazenado em tanques coletivos e individuais. Estes pesquisadores obtiveram contagens entre $2,2 \times 10^2$ UFC/mL e $1,0 \times 10^7$ UFC/mL. Santos & Bergman (2003) analisaram 125 amostras de leite da região serrana do Estado de Santa Catarina e obtiveram contagens médias de $2,1 \times 10^6$ UFC/mL.

Sabe-se, no entanto, que *American Public Health Association* (APHA, 1982) recomenda um limite máximo tolerável de 2 UFC/cm² para que uma superfície esteja adequada para processar alimentos, enquanto a Organização Mundial de Saúde (OMS) sugere 30 UFC/cm², o que indica falhas na higienização de mais de 50% dos tanques de resfriamento de leite analisados neste trabalho.

Dada à capacidade de bactérias psicrotróficas aderirem em superfícies, como observado nesta pesquisa, deve-se salientar a importância de um programa efetivo de limpeza e sanificação que deve ser incluído desde o início do processo o qual deverá inibir a acumulação de partículas e células bacterianas nas superfícies dos equipamentos e, conseqüentemente a formação de biofilme (Hauser et al., 2008).

Observa-se então que a adesão bacteriana irá reduzir a eficiência da higienização dos equipamentos e utensílios utilizados na produção e armazenagem do leite, devido ao fato de as células aderidas serem mais resistentes à ação de sanificantes em relação às células planctônicas (Zotolla & Sasahara, 1994; Craven & MACauley, 1992).

Muitos pesquisadores têm discutido sobre a resistência de bactérias a agentes sanificantes e a antimicrobianos quando em biofilme, que pode variar de quinhentas (Costerton et al., 1995) a mil vezes (Drenkard, 2003).

A elevada população de psicrotróficos nos tanques analisados leva a uma preocupação no quesito qualidade, pois as células desses microrganismos aderidos nas superfícies analisadas podem ser liberadas quando em contato com o leite, e algumas espécies de *Pseudomonas*, como *P. fluorescens*, apresentam

um tempo de geração curto sob baixas temperaturas. Uma única UFC de *Pseudomonas fluorescens* com tempo de geração de 9,4 horas crescida a 4°C é capaz de causar deterioração no leite depois de 10 dias de estocagem com contagens de 3×10^7 UFC/mL (Sorhaug & Stepaniak, 1997).

Murphy & Boor (1996) descreveram que a causa mais freqüente de contagens elevadas de bactérias psicrotróficas em leite é representada pelo uso de procedimentos de higienização inadequados no sistema de produção, considerando que resíduos de leite presentes nas superfícies dos equipamentos constituem nutrientes para o crescimento de bactérias que contaminam o produto em etapas subseqüentes ao processamento. Além disso, o contato do leite com animais sujos, com ambientes inadequados de produção e falhas na velocidade de resfriamento do leite para temperaturas inferiores a 4,4°C podem resultar em contagens microbianas elevadas.

Nesta pesquisa foram selecionados 277 isolados Gram-negativos, sendo que destes 78 apresentaram reação positiva para o teste de oxidase e metabolismo oxidativo e fermentativo, sendo submetidos à identificação bioquímica pelo API 20NE. Outros 199 isolados apresentaram reação negativa para o teste de oxidase e metabolismo fermentativo sendo submetidos à identificação bioquímica pelo BacTray I e II.

Dentre as bactérias identificadas pelo API 20NE, *Pseudomonas cepacia* (37) teve maior frequência, seguido por *Aeromonas hydrophila* (13), *Pseudomonas fluorescens* (11), *Vibrio vulnificus* (3), *Agrobacterium radiobacter* (3), *Pseudomonas aeruginosa* (3), *Pseudomonas chlororophis* (4), *Pseudomonas stutzeri* (2), *Moraxella* sp. (1) e *Acinetobacter parimani* (1).

O gênero *Pseudomonas* representou o maior número de bactérias identificadas (57), sendo *Pseudomonas cepacia* a espécie predominante. Esses resultados vão de encontro com os obtidos em leite cru refrigerado em tanques de resfriamento. Adams et al. (1975) constataram que de 70% a 90% dos

psicrotróficos isolados de leite cru estocado a 4°C, por uma semana, eram *Pseudomonas*. Eneroth et al. (1998) 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 predominância desse gênero pode ser explicada pelo fato de *Pseudomonas* sp. apresentar um tempo curto de geração em temperaturas entre 0°C e 7°C (Sorhaug & Stepaniak, 1997). Outro fator que vem sendo comprovado em diversos trabalhos é a capacidade de formação de biofilme de membros desse gênero, que está associada com a capacidade de síntese de exopolissacarídeos. A presença de fímbrias e flagelos nos microrganismos deste gênero facilita a adesão e a formação de biofilme em superfícies de aço inoxidável, que têm a remoção dificultada pelo processo de higienização, principalmente pela resistência a agentes sanificantes (Sorhaug & Stepaniak, 1997; Flint et al., 2000; Pinto et al., 2006).

Dentre as 199 bactérias psicrotróficas, oxidase-negativas que apresentaram metabolismo fermentativo analisadas pelo Bactray I e II, destacam-se *Klebsiella ozaenae* (35), *Serratia liquefaciens* (33), *Hafnia alvei* (27), *Shigella dysenteride* (19), *Escherichia coli* (18), *Shigella flexneri* (17), *Serratia plymuthica* (8), *Yersinia enterocolitica* (5), *Klebsiella oxytoca* (5), *Serratia odorifera* (3), *Lecleria adecarvoxylata* (3), *Citrobacter freundii* (3), *Salmonella* sp. (3), *Yersinia kristensenii* (3), *Klebsiella rhinoschleromatis* (3), *Salmonella choleraesuis* (2), *Enterobacter cloacae* (3), *Shigella sonnei* (1), *Enterobacter sakazaki* (1), *Edwarsiella tarda* (1), *Salmonella paratyphi* (1), *Yersinia frederiksenii* (1), *Providencia stuartii* (1), *Yersinia pseudotuberculosis* (1), *Pantoea dispersa* (1) e *Enterobacter aerogenes* (1). O gênero *Klebsiella* encontra-se dentro dos grupos dos coliformes cuja presença em alimento indica contaminação por material de origem fecal. As principais fontes de

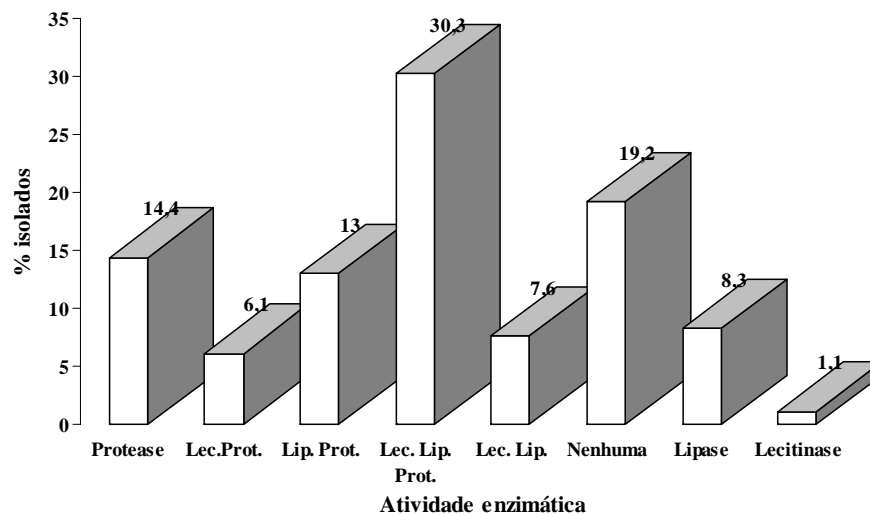
contaminação do por *Klebsiella* são ambientes de produção mal higienizados (El-Sukhon, 2003).

A bactéria *Hafnia alvei* representou 13,56% dos microrganismos isolados e está envolvida na deterioração de vegetais e carnes refrigerados em temperaturas entre 0°C e 7°C, além de ter sido detectada em moscas de estábulo (Jay, 2005; Dogan & Boor, 2003). A localização de tanques de resfriamento de leite próximo a pocilgas e estábulos pode influenciar na contaminação por enterobactérias pela presença de roedores, mosquitos, além de galinhas e animais domésticos.

Em pesquisa realizada por Moraes et al. (2004), ao avaliarem a capacidade da mosca de estábulo (*Stomoxys calcitrans* Linnaeus, 1758) em carrear enterobactérias, isolaram dentre as moscas desta espécie *Shigella flexneri*, *Salmonella sp* e *Enterobacter sp*. Fator preocupante observado neste trabalho foi, a elevada incidência de *Shigella sp.*, pois as bactérias pertencentes a esse gênero são responsáveis pela shigelose ou doença bacilar, uma infecção alimentar que acomete principalmente crianças entre 1 e 10 anos. Estudos epidemiológicos associam sua presença em alimentos com a contaminação por manipuladores e água contaminada com matéria fecal, sendo indicadores de falhas nas condições higiênico sanitárias (Jay, 2005).

As bactérias psicrotróficas detectadas neste trabalho podem ser provenientes de água, solo, vegetação e úbere (Thomas & Thomas, 1973). Santana et al. (2001) 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 10^7 UFC/mL.

Neste trabalho os isolados apresentaram elevada atividade proteolítica e lipolítica, enquanto a atividade de lecitinase foi pouco pronunciada (Figura 1).



Legenda: Lip: Lipase; Lec.: Lecitínase; Prot.: Protease

FIGURA 1: Distribuição do percentual de isolados com atividade proteolítica, lipolítica e de lecitínases que foram identificados a partir da parede, fundo e pá de homogeneização de tanques coletivos de resfriamento de leite.

Na literatura existem disponíveis muitos trabalhos que demonstram a capacidade de síntese dessas enzimas hidrolíticas por espécies do gênero *Pseudomonas*, predominante entre os isolados identificados pelo API 20NE neste trabalho. Dogan & Boor (2003) evidenciaram que 69% dos 338 isolados identificados de *P. fluorescens* isoladas de leite cru apresentaram atividade proteolítica e de lecitínase, enquanto apenas 14,5% dos isolados de *P. putida* produziram essas enzimas hidrolíticas.

Variação no grau de atividade das enzimas proteolíticas foi observada nesta pesquisa, visto que 63,8% dos 277 isolados apresentaram atividade proteolítica, 59,20% atividade lipolítica e 45,10% apresentaram atividade de lecitínase. Essa variação também foi obtida nas pesquisas de Wang & Jayarao

(2001) que observaram em 55 isolados de *Pseudomonas fluorescens* obtidos de leite cru, atividade proteolítica em 80, 91 e 58% de atividade lipolítica em 7%, 44% e 7% dos isolados quando cultivados a 7°C, 22°C e 32°C, respectivamente. E Hantsis-Zacharov & Halpern (2007), ao avaliarem 33 isolados do gênero *Pseudomonas*, observaram que a atividade lipolítica foi superior entre os isolados, sendo detectada em 74% dos isolados.

O perfil de resistência e o índice de multirresistência de 33 isolados submetidos ao teste antibiograma estão demonstrados nas Tabelas 2 e 3.

TABELA 2: Perfil de multirresistência de bactérias isoladas de tanques coletivos de resfriamento de leite localizados nas cidades de Aguanil, Campo Belo, Boa Esperança, Candeias, Coqueiral e Nepomuceno e identificadas pelo API 20 NE e Bactray I e II.

Microrganismo	N° isolados	Número de espécies resistentes								
		TE	NOR	NOV	LIN	ERI	CRX	EST	C	AMP
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	3	2	0	2	3	3	2	3	2	3
<i>Serratia liquefaciens</i>	8	2	0	8	7	7	5	3	6	7
<i>Pseudomonas cepacia</i>	6	0	1	5	6	6	6	2	4	6
<i>Shigella flexneri</i>	3	1	1	3	3	3	3	1	2	3
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0
<i>Enterobacter cloacae</i>	2	0	0	2	2	2	0	0	0	0
<i>Yersinia enterocolitica</i>	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1
<i>Aeromonas hydrophila</i>	2	0	0	0	2	2	1	0	0	2
<i>Serratia plymuthica</i>	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1
<i>Vibrio vulnificus</i>	2	1	0	2	2	2	1	1	1	2
<i>Hafnia alvei</i>	4	1	1	1	3	3	3	1	2	3

Tetraciclina (TET), Norfloxacin (NOR), Novobiocina (NOV), Lincomicina (LIN), Eritromicina (ERI), Cefuroxima (CRX), Estreptomicina (EST), Cloranfenicol (CLO), Ampicilina (AMP).

TABELA 3: Índice de múltipla resistência a antibióticos de bactérias isoladas de tanques coletivos de resfriamento de leite localizados nas cidades de Aguanil, Campo Belo, Boa Esperança, Candeias, Coqueiral e Nepomuceno e identificadas pelo API 20 NE e BacTray I e II.

Microrganismos	N° de isolados	Índice MAR (índice de múltipla resistência)									
		0	0,11	0,22	0,33	0,44	0,55	0,66	0,77	0,88	1
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	3	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0
<i>Serratia liquefaciens</i>	8	0	0	0	0	0	3	3	1	1	0
<i>Pseudomonas cepacia</i>	6	0	0	0	0	1	1	1	3	0	0
<i>Shigella flexneri</i>	3	0	0	0	0	0	0	2	0	1	0
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>Enterobacter cloacae</i>	2	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0
<i>Yersinia enterocolitica</i>	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>Aeromonas hydrophila</i>	2	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
<i>Serratia plymuthica</i>	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
<i>Vibrio vulnificus</i>	2	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
<i>Hafnia alvei</i>	4	0	0	0	0	0	2	1	1	0	0

A resistência a norfloxaxina foi observada nos isolados de *Pseudomonas cepacia*, *Shigella flexneri* e *Hafnia alvei*, sendo que os demais isolados foram susceptíveis a tal antibiótico. Embora a resistência a quinolonas resulte principalmente de mutações cromossômicas, esta pode também ser mediada por plasmídeos que codificam proteínas Qnr, as quais protegem o DNA, ligando-se às quinolonas e comprometendo sua eficácia (Nordmann & Poirel, 2005).

Todos os isolados apresentaram índice MAR superior a 0,20 (Krumperman, 1983), indicando múltipla resistência. Valores inferiores foram obtidos por Munsch-Alatossava & Alatossava (2006) ao avaliarem o perfil de 60 bactérias psicrotróficas isoladas de leite cru; 60% apresentaram multirresistência a antibióticos B-lactâmicos e não B-lactâmicos representativos de 5 classes.

A elevada resistência observada no presente estudo pode ser justificada pela diversidade de isolados identificados nos tanques de resfriamento de leite, sendo que a múltipla resistência a antibióticos é alta em ambientes nos quais o uso de drogas é intenso e constante (Vivekanandhan et al., 2002).

5 CONCLUSÃO

Foi detectada uma elevada diversidade bacteriana entre os isolados com predominância de bactérias do gênero *Pseudomonas* identificada pelo API 20NE e do gênero *Serratia* identificada pelo BacTray I e II. A produção de protease e lipase foi elevada entre os isolados, sendo que a atividade da lecitinase foi menos pronunciada. O índice de multirresistência foi observado em todos os isolados submetidos ao antibiograma.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, D.M.; BARACH, I. T.; SPEC, M.L. Heat resistant proteases produced in milk by psychrotrophic bacteria of dairy origin. **Journal of Dairy Science**, v.58, p.828-835, 1975.

AMERICAN PUBLIC ASSOCIATION. Milk and milk products. In: _____. **Compendium of methods for the microbiological examination for foods**. Washington, 1982. p.837-856.

CARVALHO, A.F.; SILVA, I.D.; CARELI, R.T.; MORELLI, A.N.; ANDRADE, N.J. Adesão de *Pseudomonas* spp. em tanques de estocagem de leite cru refrigerado granelizado na micro-região de Viçosa/MG. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 2., 2006, Goiânia. Anais... Goiânia: 2006. v. 1, p. 1-1.

COSTERTON, W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D.E.; KORBER, D.R.; LAPPIN SCOTT, H.M. Microbial biofilms. **Annual Review of Microbiology**, v.49, p.711-745, 1995.

CRAVEN, H.M.; MACAULEY, B.J. Microorganisms in pasteurized milk after refrigerated storage. 1. Identification of types. **Australian Journal Dairy Technology**, v.47, p.38-45, 1992.

COUSIN, M.A. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: a review. **Journal of Food Protection**, v.45, p.172-207, 1982.

DOGAN, B.; BOOR, K. J. Genetic diversity and spoilage potentials among *Pseudomonas* spp. isolated from fluid milk products and dairy processing plants. **Applied Environmental Microbiology**, v.69, p.130-138, 2003.

DRENKARD, E. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Review. **Microbes and Infection**, v.5, p.1213-1219, 2003.

EL-SUKHON, S.N. Identification and characterization of *Klebsiella* isolated from milk and milk products. **Journal of Food Microbiology**, v.20, p.225-230, 2003.

ENEROTH, A.; CHRISTIANSSON, A.; BRENDENHAUG, J.; MOLIN, G. Critical contamination sites in the production line of pasteurized milk with

reference to the psychrotrophic spoilage flora. **International Dairy Journal**, v.8, p.829-834, 1998.

FLINT, S.H.; BROOKS, J.D.; BREMER, P.J. (2000) Properties of the stainless steel substrate, influencing the adhesion of thermo-resistant streptococci. **Journal of Food Engineering**, v.43, p.235-242, 2000.

HANTSIS-ZACHAROV, E.; HALPERN, M. Culturable psychrotrophic bacterial communities in raw milk and their proteolytic and lipolytic traits. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, n.22, p.7162-7168, 2007.

HAUSER, G.; CURIEL, G.J.; BELLIN, H.W.; CNOSSEN., H.J.; HOFMANN, J.; KASTELEIN, J.; PARTINGTON, E.; PELTIER, Y.; TIMPERLEY, W. Disponível em: <www.ehedg.org/guidelines/doc8.htm>. Acesso em: 12 set. 2008.

JAY, J.M. **Microbiologia de alimentos**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. p.711.

KOKA, R.; WEIMER, B.C. Influence of growth conditions on heat stable phospholipase activity in *Pseudomonas*. **Journal Dairy Research**, v.68, p.109-116, 2001.

KRUMPERMAN, P.H. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of food. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, p.40-42, 1983.

MORAES, A.P.; BADINI, P.V.; SOUZA, M.M.S.; BITTENCOURT, A.J. Avaliação da capacidade de *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus, 1758) em carrear bactérias envolvidas nas etiologias das mastites de municípios do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, n.13, v.4, p.143-149, 2004.

MUNSCH-ALATOSSAVA, P.; ALATOSSAVA, T. Phenotypic characterization of raw milk-associated psychrotrophic bacteria. **Microbiology Research**, v.161, p.334-346, 2006.

MURPHY, S.C.; BOOR, K.J. Trouble-sooting sources and causes of high bacteria counts in raw milk. **Dairy Food and Environmental Sanitation**, v.20, p.49, p.67-72, 1996.

NORDMANN, P.; POIREL, L. Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in Enterobacteriaceae. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.56, p.463-563, 2005.

NUÑEZ, M.; NUÑEZ, J. A. Proteasas de psicrotrofos gram negativos: efectos sobre la leche y los pbacilliuctos lácteos. **Revista Espanola de Lecheria**, Madrid, n.130, p.251-260, 1983.

PINTO, C.L.O.; MARTINS, M.L.; VANETTI, M.C.D. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicotróficas proteolíticas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.26, n.3, p.645-651, 2006.

RAJMOHAN, S.; DODD, C.E.R.; WAITES, W.M. Enzymes from isolates of *Pseudomonas fluorescens* involved in food spoilage. **Journal of Applied Microbiology**, v.93, p.205-213, 2002.

RIVERA-TAPIO, J.A. Antibiotic resistance public heath problem. **Anales Mewdicos Hospital ABC**. México, v.48, n.4, p.42-47, 2003.

SALISBURY, J.G.; NICHOLLS, T.J.; LAMMERDING, A.M.; TURNIDGE, J.; NUNN, M. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.20, p.153-164, 2002.

SANTANA, E.H.W.; BELOTI, V.; BARROS, M.A.F.; MORAES, L.B.; GUSMÃO, V.V.T.; PEREIRA, M.S. Contaminação do leite em diferentes pontos do processo de produção: I Microrganismos aeróbios mesófilos e psicotróficos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.22, n.2, p.145-154, 2001.

SANTOS, D.; BERGMANN, G.P. Influência da temperatura durante o transporte, sobre a qualidade microbiológica do leite cru. III – Psicotróficos. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.17, n.111, p.86-91, 2003.

SHAH, N.P. Psychrotrophs in milk: a review. **Milchwissenschaft**, v.49, p.432-437, 1994.

SORHAUG, T.; STEPANIAK, L. Psychrotrophs and theis enzymes in Milk and dairy products: Quality aspects. **Trends in Food Science & Technology**, v.8, p.35-41, 1997.

TEALE, C.J. Antimicrobial resistance na the food chain. **Journal Applied Microbiology**. Symposium Supplement, v.92, p.85-89,2002.

TERNSTROM, A.; LINDBERG, A.M.; MOLIN, G. Classification of the spoilage flora of raw and pasteurized bovine milk, with special reference to *Pseudomonas* and *Bacillus*. **Journal Applied Bacteriology**, v.75, p.25–34, 1993.

THOMAS, S. B., THOMAS, B. F. Psychrotrophic bacteria in refrigerated bulk-collected raw milk. **Dairy Industry**, v.38, p.61–70, 1973.

VIVEKANANDHAN, G.; SAVITHAMANI, K.; HATHA, A.A.M.; LAKSHAMANAPERUMALSAMY, P. Antibiotic resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated marketed fish of South India. **International Journal of Food Microbiology**, v.76, p.165-188, 2002.

WANG, L.; JAYARO, B.M. Phenotypic and genotypic characterization of *Pseudomonas fluorescens* isolated from bulk tank milk. **Journal of Dairy Science**, v.84, p.1421-1429, 2001.

WIEDMANN, M.; WEILMEIER, D.; DINEEN, S. S.; RALYEA, R.; BOOR, K. Molecular and phenotypic characterization of *Pseudomonas* spp. Isolated from milk. **Applied Environmental Microbiology**, v.66, p.2085–2095, 2000.

WIKING, L.; FRIST, M.B.; LARSEN, L.B.; NIELSEN, J.H. Effects of storage conditions on lipolysis, proteolysis and sensory attributes in high quality raw milk. **Milchwissenschaft**, v.57, n.4, p.190-194, 2002.

ZOTOLLA, E.A.; SASAHARA, K.C. Microbial biofilms in the food processing industry – Should they be a concern? **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.23, n.2, p.125-148, 1994.

CAPÍTULO 2

**PRODUÇÃO DE HOMOSERINA LACTONA ACILADA POR
Pseudomonas fluorescens E *Serratia liquefaciens* ISOLADAS DE
TANQUES DE RESFRIAMENTO DE LEITE.**

**PRODUÇÃO DE HOMOSERINA LACTONA ACILADA POR
Pseudomonas fluorescens E *Serratia liquefaciens* ISOLADAS DE
TANQUES DE RESFRIAMENTO DE LEITE .**

Preparado de acordo com as normas da revista *Food Control* (Comentários)

S. C. MARQUES^{a*}, R. H. PICCOLI^a

^a Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras – UFLA, Campus da UFLA, Caixa Postal 3037, Lavras, MG, 37200-000.

*Corresponding Author. Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras. Caixa Postal: 3037. CEP 37200-000. Tel.: 55 35 3829 1656; fax: 55 35 38291391.

E-mail address: simone.cm@superig.com.br (S. C. Marques), rhpicoli@ufla.br (R. H. Piccoli).

1 RESUMO

O sistema de *quorum sensing* em bactérias Gram-negativas ocorre via homoserina lactona acilada (AHL). A autoindução tem grande importância na regulação de vários fenótipos, dentre eles a produção de enzimas, a formação de biofilme e a resistência a agentes antimicrobianos. Dentre os sistemas de monitoramento utilizados para detecção de AHL, destaca-se *Agrobacterium tumefaciens* A136 que detecta a produção de AHL com 4 a 12 carbonos. O objetivo deste trabalho foi detectar a produção de AHL utilizando *A. tumefaciens* A136 como estirpe monitora em 2 isolados de *Pseudomonas fluorescens* e em 6 isolados de *Serratia liquefaciens* provenientes de tanques coletivos de resfriamento de leite. As placas de Petri contendo LB foram suplementadas com X-Gal e incubadas a 28°C/72 h. A produção de coloração azul pela estirpe monitora indica resultado positivo, o que foi observado em todos os isolados testados.

Palavras-chave: *quorum sensing*, bactéria psicrotrófica, homoserina lactona acilada.

2 ABSTRACT

The quorum sensing system in Gram-negative bacteria is mediated by chemical signals such as acylated homoserine lactone (AHL). The self-induction possesses a great importance in the regulation of several phenotypes, out of them the production of enzymes, the formation of biofilm and the resistance to antimicrobial agents. Out of the monitoring systems utilized for detecting AHL, *Agrobacterium tumefaciens* A136 stands out which detects the production of AHL with 4 to 12 carbons. The objective of this work was to the production of AHL by using *A. tumefaciens* A136 as a monitor strain in 2 *Pseudomonas fluorescens* isolates and in 6 *Serratia liquefaciens* isolates coming from collective milk-cooling tanks. The Petri dishes containing LB culture medium supplemented with X-Gal were incubated at 28°C/72 h. the production of blue coloration by the monitor strain indicates a positive result, which was observed in all the tested isolates.

Key-words: *quorum sensing*, psychrotrophic bacteria, *acylated homoserine lactones* (AHL).

3 INTRODUÇÃO

Bactérias psicrotróficas Gram-negativas são predominantes na microbiota do leite cru refrigerado. Apesar de a maioria não resistir aos tratamentos térmicos aplicados ao leite, muitas espécies são produtoras de lipases e proteases extracelulares resistentes a altas temperaturas, permanecendo no leite processado, resultando na perda de sua qualidade. Essas enzimas são secretadas no final da fase exponencial e permanecem ao longo da fase estacionária de crescimento onde a densidade celular é elevada (Rajmohan et al. 2002).

Quorum sensing ou autoindução são termos utilizados para descrever um sistema de senso ambiental que permite à bactéria monitorar sua própria densidade populacional, ativando ou reprimindo a expressão gênica (Fuqua et al. 1994; Shapiro, 1998; Swift et al. 1999). Em bactérias Gram-negativas, quase todos os autoindutores pertencem à família das N-acil-L-homoserina lactonas (AHLs) (Fuqua et al., 1994; Fuqua & Winans, 1996; Swiht et al., 1999; Câmara et al., 1998).

Em bactérias Gram-negativas, a sinalização via AHL tem papel importante na regulação de vários fenótipos como a biossíntese de antibióticos (Rasmussen & Givskov, 2006), produção de fatores de virulência (Smith & Iglewski, 2003), biossíntese de exopolissacarídeos, *swarming* bacteriana (Givskovi et al., 1998), transferência de plasmídeos conjugativos, produção de pigmentos (Mc Clean et al., 1997) e produção de enzimas extracelulares (Lewenza et al., 1999; Swift et al., 1999; Riedel et al., 2001), além do desenvolvimento de um biofilme (Nilsson et al., 2000).

Diversos membros da família *Enterobacteriaceae* têm sido estudados por terem a regulação de genes mediados pela síntese de AHL. O sistema de *quorum sensing* em *Serratia liquefaciens* compreende a proteína SwrI,

responsável pela síntese de HSL de 4 e 6 carbonos e da proteína reguladora SwrR. Esse sistema de autoindução é muito similar ao apresentado por *Vibrio fischeri* (Gram et al., 1999; Daniels et al., 2004). *Serratia liquefaciens*, um patógeno oportunista presente na água, solo, trato digestivo de roedores, plantas, insetos, peixe e em humanos, tem a capacidade de secretar enzimas hidrolíticas (Grimont & Grimont, 1978).

Diversos têm sido os estudos para se detectar as moléculas sinalizadoras em *Pseudomonas fluorescens*. Shaw et al. (1997) reportaram a existência de quatro moléculas diferentes de AHL em *P. fluorescens* 2-79, estirpe produtora do antibiótico fenazina. O sistema é composto pelos genes *phzR* e *phzI*, homólogos da família *luxR-luxI* (Khan et al., 2005). Laue et al. (2000) observaram que *P. fluorescens* F113 produz três diferentes AHLs e que o gene *hdtS* é capaz de direcionar a síntese de todas as três AHLs.

Vários são os sistemas de monitoramento utilizados para detecção de AHL que empregam bactérias como indicadoras, entre elas *Agrobacterium tumefaciens* A136 (Fuqua & Winans, 1996; Shaw et al., 1997), *Chromobacterium violaceum* CV026, *C. Violaceum* LMG 1267; *Escherichia coli* transformada com plasmídeo pSB403, *E. Coli* MT102; *Agrobacterium tumefaciens* KYC55, *Agrobacterium tumefaciens* NTL4, *A. tumefaciens* KYC6, *Pseudomonas aeruginosa* PA01; *Serratia liquefaciens* MG1 e *Serratia liquefaciens* MG44. Plasmídeos como pCF372, pCF218, pJBA132, pTS400 também têm sido empregados para este fim (Van-Houdt et al. 2003; Ravn et al. 2001). A estirpe *A. tumefaciens* A136 contém uma fusão do gene *lacZ* ao gene *traI* e produz coloração azul na presença de X-Gal em resposta a AHL, com substituições oxo com 4 a 12 carbonos (Shaw et al., 1997).

Pelo exposto acima, esta pesquisa teve como objetivo detectar a produção de homoserina lactona acilada em estirpes de *Serratia liquefaciens* e

Pseudomonas fluorescens isoladas de tanques de resfriamento de leite coletivos, utilizando *Agrobacterium tumefaciens* A136 como monitora.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A produção de homoserina lactona acilada (AHL) foi observada em 6 isolados de *Serratia liquefaciens* e 2 de *Pseudomonas fluorescens* isoladas de tanques coletivos de resfriamento de leite. As bactérias foram estocadas em meio contendo 0,5% peptona bacteriológica, 0,3% de extrato de levedura, 0,5% de NaCl e 15% glicerol, e mantidas a -20°C, reativadas em Lúria-Berthani (LB) e incubadas a 28°C por 24 horas. A estirpe monitora *Agrobacterium tumefaciens* A136 foi cultivada em caldo LB suplementado com canamicina 20 µg/ mL e incubada a 28°C por 24 horas.

A produção de AHL foi avaliada de acordo com Ravn et al. (2001). As linhagens testadas foram estriadas paralelamente à estirpe monitora em placas com ágar LB suplementado com 50 µg/mL de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosídeo (X-GAL), com incubação a 25°C/72 horas. O resultado positivo caracteriza-se pela produção de um pigmento azul pela estirpe monitora em resposta à AHL expressa pelos isolados de *S. liquefaciens* e *P. fluorescens*.

Como controle positivo foi utilizado *P. fluorescens* ATCC 13525 e como controle negativo a estirpe monitora foi estriada paralela a ela mesma.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As estirpes testadas demonstraram resultado positivo para produção de AHL a partir da estirpe monitora *Agrobacterium tumefaciens* A136 como observado na Figura 1.

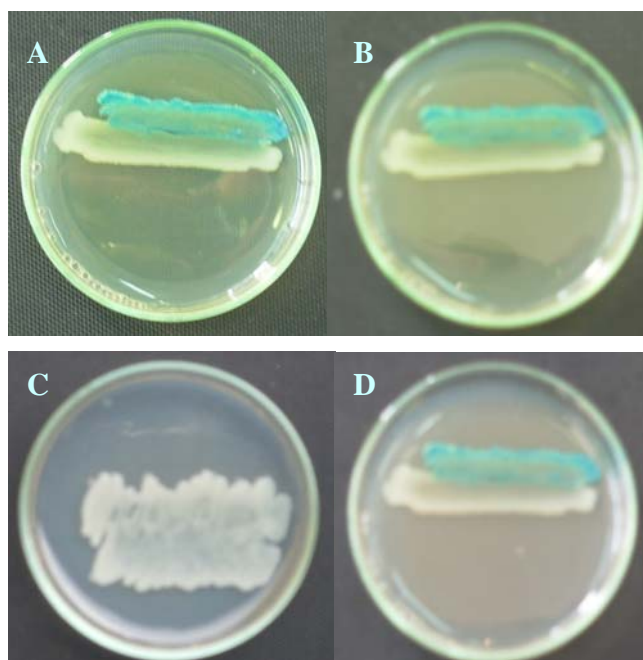


FIGURA 1: Ensaio para produção de homoserina lactona acilada em placa em *Serratia liquefaciens* e *Pseudomonas fluorescens* isoladas de tanques coletivos de resfriamento de leite. **A:** *Agrobacterium tumefaciens* A136 em paralelo a *Serratia liquefaciens*. **B:** *Agrobacterium tumefaciens* A136 em paralelo a *Pseudomonas fluorescens*. **C:** *Agrobacterium tumefaciens* A136 paralela a ela mesma (controle negativo). **D:** *Agrobacterium tumefaciens* A136 em paralelo a *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525 (controle positivo).

Pesquisas de AHLs produzidas por espécies do gênero *Pseudomonas* utilizando-se *Agrobacterium tumefaciens* como sistema monitor tem sido empregada (Ravn, et al., 2001; Elasri et al. 2004; Pinto et al., 2007). Pinto et al. (2007), ao avaliarem a produção de AHL por bactérias psicrotólicas isoladas do leite cru, observaram que sistema monitor mais eficiente em detectar AHL produzida por *P. fluorescens* foi a estirpe monitora *Agrobacterium tumefaciens* A 136. No entanto, esses mesmos autores, ao avaliarem a produção de AHL por 9 isolados de *Serratia liquefaciens*, verificaram que somente duas foram positivas utilizando esta estirpe monitora.

A importância da detecção da produção de AHL por bactérias isoladas de tanques de resfriamento coletivo advém do fato de que a produção de enzimas hidrolíticas associadas com a deterioração do leite é regulada pelo sistema de *quorum sensing* em *Pseudomonas fluorescens* (Liu et al., 2007). Fato que também foi mencionado por Whan et al. (2000) ao sugerirem que o *quorum sensing* está envolvido com o crescimento de *Pseudomonas fluorescens* e deterioração do leite.

A detecção de AHL em *Serratia liquefaciens* também foi observada por Eberl et al., (1999) que detectaram AHL em sobrenadantes de células de *Serratia liquefaciens* MG1, enquanto Christensen et al. (2003) demonstram que AHL estava envolvida na deterioração de amostras de leite inoculadas com *Serratia* sp.

6 CONCLUSÃO

Foi detectada em 100% dos isolados a produção de homoserina lactona acilada.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CAMARA, M.; DAYKIN, M.; CHHABRA, S.R. Detection, purification, and synthesis of N-acylhomoserine lactone quorum sensing signal molecules. **Methods Microbiology**, v.27, p.319-330, 1998.
- CHRISTENSEN, A.B.; RIEDEL, K.; EBERL, L.; FLODGAARD, L.R.; MOLIN, S.; GRAM, L. Quorum-sensing-directed protein expression in *Serratia proteomaculans* B5a. **Microbiology**, n. 149, v.2, p. 471-483. 2003.
- DANIELS, R., VANDERLEYDEN, J.; MICHIELS, J. Quorum sensing and swarming migration in bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v.28, p. 261-289, 2004.
- EBERL, L., MOLIN, S.; GIVSKOV, M. Surface motility of *Serratia liquefaciens* MG1. **Journal of Bacteriology**, v.181, p.1703–1712, 1999.
- ELASRI, M.; DELORME, S.; LEMANCEU, P.; STEWART, G.; LAUE, B.; GLICKMANN, E.; OGER, P.M.; DESSAUX, Y. Acyl-homoserine lactone production is more common among plant-associated *Pseudomonas* spp. Than among soilborne *Pseudomonas* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p.1198-1209, 2001.
- FUQUA, C.; WINANS, S.C. Conserved-acting promoter elements are required for density-dependent transcription of *Agrobacterium tumefaciens* conjugal transfers genes. **Journal of Bacteriology**, v.178, n.2, p.435-440, 1996.
- FUQUA, W.C.; WINANS, S.C.; GREENBERG, E.P. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. **Journal of Bacteriology**, v.176, n.2, p.269-275, 1994.
- GIVSKOV, M.; ÖSTLING, J., EBERL, L.; LINDUM, P.W.; CHRISTENSE, A.B.; CRISTIENSEN, G.; MOLIN, S.; KJELLEBERG, S. Two Separate Regulatory Systems Participate in Control of Swarming Motility of *Serratia liquefaciens* MG1. **Journal of Bacteriology**, v.180, n.3, p.742-745, 1998.
- GRAM, L.; CHRISTENSEN, A.B.; RAVNS, L.; MOLIN, S.; GIVSKOV, M. Production of acylated homoserine lactones by psychrotrophic members of the enterobacteriaceae isolated from foods. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, n.5, p.3458-3463, 1999.

GRIMONT, P. A. D.; GRIMONT, F. The genus *Serratia*. **Annual Review Microbiology**, v.32, p.221–248, 1978.

KHAN, S.R.; MAVRODI, D.V.; JOG, G.J.; SUGA, H.; THOMASHOW, L.S.; FARRAND, S.K. Activation of the *phz* operon de *Pseudomonas fluorescens* 2-79 requires the LuxR homolog PhzR, N-(3-OH-Hexanoyl)-L-Homoserine lactone produced by the LuxI monolog PhzI, and a cis-acting *phz* Box. **Journal of Bacteriology**, v.187, p.6517-6527, 2005.

LAUE, B.E.; JIANG Y.; CHHABRA S.R.; JACOB S.; STEWART G.S.A.B.; HARDMAN A.; DOWNIE J.A.; O’GARA F.; WILLIAMS P. The biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* F113 produces the Rhizobium small bacteriocin, N-(3-hydroxy-7-cistetradecenoyl) homoserine lactone, via HdtS, a putative novel N-acylhomoserine lactone synthase. **Microbiology**, v.146, p.2469-2480, 2000.

LEWENZA, S.; CONWAY, B.; GREENBERG, E.P.; SOKOL, P.A. Quorum sensing in *Burkholderia cepacia*: identification of the LuxRI homologs CepRI. **Journal Bacteriology**, v.181, p.748-756, 1999.

LIU, M.; WANG, H.; GRIFFITHS, M.W. Regulation of alkaline metalloprotease promoter by N-acyl homoserine lactone quorum sensing in *Pseudomonas fluorescens*. **Journal Applied Microbiology**, v.106, n.3, p.2174-2184, 2007.

MC CLEAN, K.H.; WINSON, M.K.; FISH, L.; TAYLOR, A.; CHABRA, S.R.; CAMARA, M.; DAYKIN, M.; LAMB, J.H.; SWIFT, S.; BYCROF, B.W.; STEWART, F.S.A.B.; WILLIAMS, P. Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acyl homoserine lactones. **Microbiology**, v.143, n.12, p.3703–3711, 1997.

NILSSON, P.; OLOFSSON, A.; FAGERLIND, M.; FAGERTROM, T.; RICE, S.; KJELLEBERG, S.; STEINBERG, P. Kinetics of the AHL regulatory system in a model biofilm system: how many bacteria constitute a “quorum”? **Journal of Molecular Biology**, v.309, n.3, p.631-640, 2000.

PINTO, U.M.; VIANA, E.S.; MARTINS, M.L.; VANETTI, M.C.D. Detection of acylated homoserine lactones in gram-negative proteolytic psychrotrophic bacteria isolated from cooled raw milk. **Food Control**, v.18, p.1322-1327, 2007.

RAJMOHAN, S.; DODD, C.E.R.; WAITES, W.M. Enzymes from isolates of *Pseudomonas fluorescens* involved in food spoilage. **Journal of Applied Microbiology**, v.93, p.205-213, 2002.

RASMUSEN, T.B.; GIVSKOV, M. Quorum-sensing inhibitors as anti-pathogenic drugs. **International Journal of Medical Microbiology**, v.296, n.2-3, p.149-161, 2006.

RAVN, L.; CHRISTENSEN, A.B.; MOLIN, S.; GIVSKOV, M. Methods for detection acylated homoserine lactones produced by Gram-negative bacteria and their application in studies for AHL-production kinetics. **Journal of Microbiological Methods**, v.44, p.239-251, 2001.

RIEDEL, K.; OHNESORG, T.; KROGLELT, K.A.T.S.; OMORI, K.; GIVSKOV, M.; EBERL, L. N-acyl-L-homoserine lactone-mediated regulation of the Lip secretion system in *Serratia liquefaciens* MG1. **Journal of Bacteriology**, v.183, p.1805-1809, 2001.

SHAPIRO, J.A. Thinking about bacterial populations a multicellular organisms. **Annual Review Microbiology**, v.52, p.81-104, 1998.

SHAW, P.D.; PING, G.; DALLY, S.L.; CHA, C.; CRONAN, J.E.J.; RINEHART, K.L. Detecting and characterizing N-acyl-homoserine lactone signal molecules by thin-layer chromatography. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.94, n.12, p.6036-6041, 1997.

SMITH, R.S.; IGLEWSKI, B.N. *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence. **Current Opinion in Microbiology**, n.6, p.56-60, 2003.

SWIFT, S.; LYNCH, M.J.; FISH, L.; KIRKE, D.F.; TOMAS, J.M.; STEWART, G.S.; WILLIAMS, P. Quorum sensing-dependent regulation and blockade of exoprotease production in *Aeromonas hydrophila*. **Infect Immunology**, v.67, p.5192-5199, 1999.

VAN HOUTT, R.; AERTSEN, A.; JANSEN, A.; QUINTANA, A.L.; MICHIELS, C.W. Biofilm formation and cell-to-cell signalling in Gram-negative bacteria isolated from a food processing environment **Journal of Applied Microbiology**, v.96, p.177-484, 2003.

WHAN, L.; DUNSTALL, G.; ROWE, M.T. A study of the growth kinetics of two pseudomonads from pasteurized milk and the possible role of *quorum sensing*. **Milchwissenschaft**, n.55, v.7, p.371-373, 2000.

CAPÍTULO 3

FORMAÇÃO DE BIOFILME POR *Pseudomonas fluorescens* e *Staphylococcus aureus* EM AÇO INOXIDÁVEL EM MONOCULTIVO E CULTIVO COMBINADO.

**FORMAÇÃO DE BIOFILME POR *Pseudomonas fluorescens* e
Staphylococcus aureus EM AÇO INOXIDÁVEL EM
MONOCULTIVO E CULTIVO COMBINADO.**

Preparado de acordo com as normas da revista *Ciência e Agrotecnologia*

Simone Cristina MARQUES^{1*}

Dieyckson Oliveira FREIRE²

Robera Hilsdorf PICCOLI³

^{1*} *Doutoranda em Ciência dos Alimentos, Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Caixa Postal 3037, CEP 372000-000, Lavras-MG. E:mail- simone_cm@terra.com.br*

² *Aluno do curso de Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Caixa Postal 3037, CEP 372000-000, Lavras-MG. E:mail: dieyckson@gmail.com*

³ *Professora adjunta, Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Caixa Postal 3037, CEP 372000-000, Lavras-MG. E:mail: rhpiccoli@ufla.br*

1 RESUMO

A adesão microbiana em superfícies como a de aço inoxidável é de grande preocupação para a indústria, visto que os microrganismos podem se aderir, multiplicar e estabelecer biofilme, que pode ser monoespécie ou multiespécie. O desenvolvimento do biofilme e a dispersão de células são regulados por *quorum sensing* que dentre vários fenótipos regula a produção de enzimas hidrolíticas como as proteases. Os objetivos desta pesquisa foram o de avaliar a formação de biofilme em aço inoxidável por *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas fluorescens* em monocultivo e cultivo combinado nos períodos de 2, 4, 6, 8 e 10 dias, nas temperaturas de 7°C e 28°C, e determinar a atividade proteolítica das células aderidas. A formação de biofilme foi observada por *P. fluorescens* tanto no monocultivo quanto no cultivo combinado, enquanto que para *S. aureus* observou-se apenas sua adesão, em ambas as formas de cultivo. Contagens superiores de *P. fluorescens* foram obtidas após sua incubação a 28°C quando comparado ao seu cultivo a 7°C. Devido à íntima relação entre a atividade proteolítica e a alta densidade celular, essa foi observada com maior intensidade no monocultivo e cultivo combinado em contagens acima de 10^6 UFC/cm² de *P. fluorescens*.

Palavras-chave: biofilme monoespécie e multiespécie, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas fluorescens*, atividade proteolítica.

2 ABSTRACT

The microbial adhesion onto surfaces such as the one of stainless steel is highly worrying to the industry, since the microorganisms can adhere, multiply and establish biofilms, these being able to be either monospecies or multispecies. Both the development of the biofilm and cell dispersion are regulated by quorum sensing which out of several phenotypes regulates the production of hydrolytic enzymes such as proteases. The objectives of this research work were the ones of evaluating the biofilm formation on stainless steel by *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas fluorescens* in monoculture and combined culture in the periods of 2, 4, 6, 8 and 10 days at the temperatures of 7°C and 28°C and determining the proteolytic activity of the adhered cells. Biofilm formation was observed by *P. fluorescens* both in monoculture and in combined culture, whereas for *S. aureus*, only its adhesion was observed in both forms of culture. Higher counts of *P. fluorescens* were obtained after incubation at 28°C as compared with its culture at 7°C. Due to the close relationship between high cell density and proteolytic activity, the latter was found with higher intensity in the monoculture and combined culture in counts above 10^5 CFU/cm² of *P. fluorescens*.

Key words: biofilm monospecies and multispecies, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas fluorescens*, proteolytic activity.

3 INTRODUÇÃO

A contaminação microbiana em superfícies de contato com alimentos é de grande preocupação para a indústria. Sob condições favoráveis, os microrganismos contaminantes podem se aderir e reproduzir e, se não removidos, contribuem para a formação de um biofilme que comprometerá a qualidade e segurança dos alimentos (Bower et al., 1996; Kusumaningrum et al. 2003).

A adesão microbiana reconhecida como o primeiro passo no desenvolvimento de biofilmes, ocorre devido à deposição de microrganismos em uma superfície de contato, onde se fixam e iniciam o crescimento. Essa multiplicação celular dará origem a colônias e, quando a massa celular for suficiente para agregar nutrientes, resíduos e outros microrganismos, estabelece-se o biofilme (Zottola & Sasahara, 1994; Valcarce et al., 2002).

Os biofilmes são constituídos por células aderidas a um substrato e embebidas em uma matriz de polímeros extracelulares, exibindo diferentes fenótipos e taxas metabólicas (Donlan & Costerton, 2002).

Em particular, o crescimento de biofilmes sobre superfícies metálicas acelera a taxa de corrosão, reduzindo a vida útil dos equipamentos industriais, tais como tanques, e gerando perdas de calor em tubos condutores (Sand, 1997). Além disso, o biofilme pode gerar contaminação cruzada de alimentos processados e superfície contaminada (Kusumaningrum et al., 2003).

Um biofilme monoespécie é constituído por uma única espécie de microrganismo, enquanto um biofilme multiespécie é formado por mais de uma espécie comumente encontrado em superfícies de contato com alimento (O'Toole et al., 2000). Na literatura estão disponíveis diversos trabalhos que observaram a formação de biofilme por *S. aureus* ou por *P. fluorescens* tanto em condições de monocultivo (Marques et al., 2007a; Lindsay et al., 2002), assim

como em cultivo combinado com outros gêneros de bactérias (Boari, 2008; Pompermayer & Gaylarde, 2000).

O desenvolvimento do biofilme e a dispersão de células são regulados por *quorum sensing* ou autoindução, que são termos utilizados para descrever um sistema de senso ambiental que permite à bactéria monitorar sua própria densidade populacional, ativando ou reprimindo a expressão gênica (Fuqua et al., 1994; Shapiro, 1998; Swift et al., 1999).

Em bactérias Gram-negativas, as moléculas autoindutoras (AIs) ou sinalizadoras são derivadas da N-acil homoserina lactona (AHL) e em muitos gêneros, como *Pseudomonas*, sua regulação se dá por meio das proteínas homólogas LuxI e Lux R (Van-Houdt & Michiels, 2003).

Em bactérias Gram-positivas, a comunicação célula-célula ocorre pela produção e transporte de oligopeptídeos autoindutores no ambiente, conhecidos como peptídeos autoindutores (AIPs) (Lyon & Novick, 2004). O sistema de *quorum sensing* em *Staphylococcus* é chamado de gene regulador acessório, gene *agr*. O sistema *agr* é composto por 2 unidades: RNAII e RNAIII, transcritas pelos promotores P2 e P3, respectivamente. O RNAII contém 4 genes (*agrB*, *agrD*, *agrC* e *agrA*). Os produtos dos genes *agrB* e *agrD* são responsáveis pela produção dos peptídeos, um autoindutor de aproximadamente 8 aminoácidos, que se liga a uma proteína transmembrana, AgrC, que age como um sensor kinase do sistema de regulação de dois componentes, AgrC ativa a resposta reguladora, AgrA, que por sua vez ativa a transcrição do RNAII e RNAIII (Kong et al., 2006).

Dentre os fenótipos regulados pelo sistema *quorum sensing* pode-se destacar a produção de enzimas hidrolíticas. A protease em *S. aureus* é um significativo fator de virulência (Dubin et al., 2008). *Pseudomonas fluorescens* tem sido isolada com frequência de leite e é responsável pela deterioração por secretar proteases (Dogan & Boor, 2003).

Pelas observações relatadas, objetivou-se com esta pesquisa avaliar a formação de biofilme em aço inoxidável por *S. aureus* e *P. fluorescens* em monocultivo e cultivo combinado nos períodos de 2, 4, 6, 8 e 10 dias nas temperaturas de 7°C e 28°C, e determinar a atividade proteolítica das células aderidas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados isolados de *S. aureus* (Marques et al., 2007a) e *P. fluorescens*, identificados a partir de tanques coletivos de resfriamento de leite, para avaliação do processo de adesão. As bactérias foram estocadas em meio de congelamento contendo 20% de glicerol (v/v) e mantidas a -20°C, sendo reativadas em caldo infusão cérebro coração (BHI) com incubação por 24 horas a 37°C e 28°C, respectivamente. Depois deste período, as culturas de *S. aureus* e de *P. fluorescens* foram estriadas em ágar tripticase de soja inclinado (TSA) e incubadas por 24 horas a 37°C e 28°C, respectivamente. Depois disso os inóculos foram padronizados em água destilada estéril para o padrão 4 da escala de Mc Farland (10^9 UFC/mL).

A adesão foi realizada em monocultivo de *S. aureus* a 7°C e 28°C, monocultivo de *P. fluorescens* a 7°C e 28°C e cultivo combinado de *S. aureus* e *P. fluorescens* a 7°C e 28°C, por 10 dias. Para avaliação da adesão foi montado um suporte em um Becker contendo 20 cupons de aço inoxidável AISI 304 de 10x20mm presos por uma linha de náilon e, em seguida, adicionado 900 mL de leite UHT desnatado e adicionado 1mL da cultura de *Staphylococcus aureus* na adesão monocultivo e 1 mL da cultura de *Pseudomonas fluorescens* monocultivo para se obter a população de 10^7 UFC/mL de leite. Na adesão de cultivo combinado foi montado um suporte em Becker e adicionados a 900 mL de leite UHT desnatado 1 mL da cultura de *S. aureus* e 1 mL da cultura de *P. fluorescens*. O experimento foi realizado em duas repetições.

A cada 48 horas, dois cupons eram retirados para quantificação das células aderidas e determinação da atividade proteolítica da bactéria aderida. Os cupons remanescentes no suporte foram imersos em NAOH 1% para remoção das células não aderidas e transferidos para um Becker estéril e adicionados 900

mL de leite UHT desnatado e novamente a cultura padronizada foi adicionada. Esse processo foi repetido até o período de 10 dias (0, 2, 4, 6, 8 e 10 dias).

Para quantificação das células aderidas no monocultivo, o suabe foi esfregado sobre a superfície do cupom e adicionado em 10 mL de água peptonada 0,1%. O tubo foi agitado em vórtex por 3 minutos; diluições seriadas foram realizadas sendo que no monocultivo de *S. aureus* a alíquota de 0,1 mL foi adicionada em Agar Baird Parker e no monocultivo de *P. fluorescens* a alíquota de 0,1 mL foi adicionada em Agar Cetrimida, adicionado de 10% de glicerol (v/v). No cultivo combinado, procederam-se as diluições seriadas a partir dos suabes dos cupons e plaqueamento em Agar Baird Parker e em Agar Cetrimida. Todas as placas foram incubadas por 24/48 horas a 37°C e 28°C, respectivamente. Depois deste período, realizou-se a contagem das colônias e o cálculo das unidades formadoras de colônias/cm².

A atividade proteolítica das células aderidas nos cupons de aço inoxidável foi realizada conforme técnica descrita por Pinto (2005) com modificações. O suabe da superfície dos cupons, seja no monocultivo de *S. aureus* e *P. fluorescens* ou no cultivo combinado, foi transferido para tubo contendo 5 mL de água destilada estéril e o tubo agitado por 3 minutos em vórtex. Alíquota de 0,1 mL da cultura centrifugada a 5000 g por 10 min. foi adicionada a 0,5 mL da solução de azocaseína (Sigma, EUA) 0,5% (p/v), dissolvida, por aquecimento, em tampão citrato 0,1 M, pH 5,0 e filtrada em papel Whatman n°1; e a 0,5 mL de tampão citrato 0,1M, pH 6.0. Após incubação a 37°C por duas horas em banho-maria com circulação, foi acionada a reação volume igual de ácido tricloroacético, TCA a 10% (p/v), seguido de banho de gelo por 15 min. As amostras foram clarificadas por centrifugação a 5000 g, por 10 minutos e a absorbância do sobrenadante medida a 366 nm, em espectrofotômetro.

Uma unidade de atividade proteolítica foi definida como a quantidade de enzima requerida pra produzir um aumento de 0,01 unidades na absorbância a 366 nm por hora de incubação. A atividade proteolítica específica foi definida como sendo atividade proteolítica por unidade de crescimento.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados evidenciam que *S. aureus* sob monocultivo e *S. aureus* com *P. fluorescens* aderiram, mas não formaram biofilme no aço inoxidável, quando cultivados em leite UAT desnatado sob as temperaturas de 7°C e 28°C, por 10 dias, com plaqueamento em ágar Baird Parker, dados representados na Figura 1.

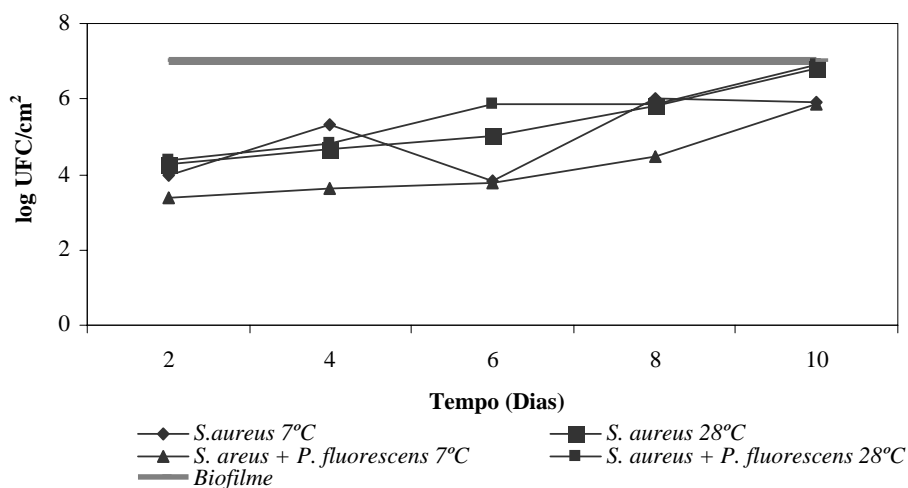


FIGURA 1: Contagem de células de *Staphylococcus aureus* aderidas de em cupons de aço inoxidável sob monocultivo e cultivo combinado com *Pseudomonas fluorescens*, nos períodos de 2, 4, 6, 8 e 10 dias de incubação nas temperaturas de 7°C e 28°C. Valores expressos em log de Unidades Formadoras de Colônias/cm².

A Figura 2 evidencia a formação de biofilme por *Pseudomonas fluorescens* sob monocultivo e cultivo combinado com *Staphylococcus* nos cupons de aço inoxidável, quando cultivados em leite UAT desnatado sob as temperaturas de 7°C e 28°C, por 10 dias, com plaqueamento em agar Cetrimida.

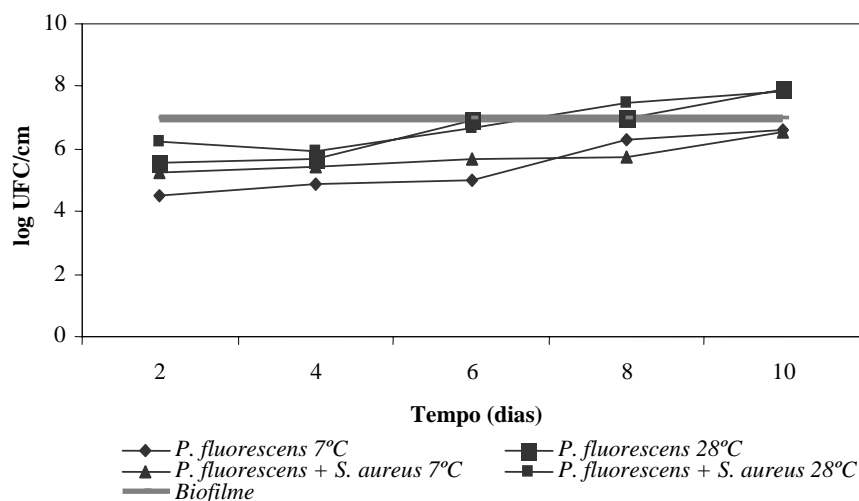


FIGURA 2: Contagem de células de *Pseudomonas fluorescens* aderidas em cupons de aço inoxidável sob monocultivo e cultivo combinado com *Staphylococcus aureus*, nos períodos de 2, 4, 6, 8 e 10 dias de incubação nas temperaturas de 7°C e 28°C. Valores expressos em log UFC/cm².

Para se considerar que células aderidas constituem um biofilme, alguns autores sugerem que sejam necessários 10⁷ UFC aderidas por cm² (Andrade et al., 1998), enquanto outros consideram o número de células aderidas de 10⁵ UFC por cm² (Ronner & Wong, 1993) e 10³ UFC por cm² (Wirtanen et al., 1996). O que pôde ser observado nesta pesquisa foram valores na ordem de 10⁷ tanto das células sob monocultivo quanto sob cultivo combinado por *P. fluorescens* indicando formação de biofilme, sendo que em *S. aureus* foi observada adesão com contagens na ordem de 10⁶ UFC/cm².

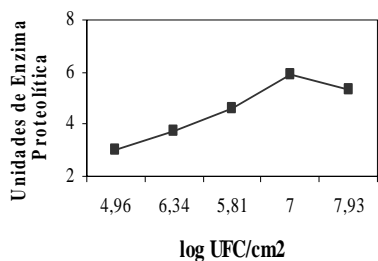
Segundo Pompermayer & Gaylarde (2000), microrganismos Gram-negativos apresentam melhor capacidade de aderir e formar biofilme devido aos aparatos celulares que apresentam (fimbrias, pili e flagelos). O que pôde ser

comprovado nesta pesquisa, em que *P. fluorescens*, uma bactéria Gram-negativa, formou biofilme ao passo que *S. aureus* uma bactéria Gram-positiva, apenas aderiu na superfície de aço inoxidável. Da mesma maneira, Boari (2008) ao estudar o biofilme multiespécie formado por *Aeromonas hydrophila* e *S. aureus* observou que a presença de *A. hydrophila* reduziu o crescimento e adesão de *S. aureus* quando utilizado o cultivo combinado.

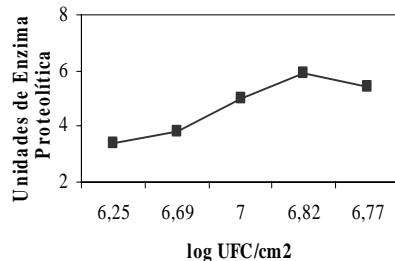
Biofilmes podem levar mais de 10 dias para atingir sua maturidade estrutural, com base em medidas microscópicas e comparações visuais. O aumento de células em um biofilme faz parte deste processo de maturação e pode ocorrer em função de divisão celular e da co-adesão de outras células que estão presentes como células planctônicas (Stoodley et al., 2002), o que pode explicar o fato de que as contagens superiores foram observadas a partir do 8º dia de incubação dos cupons, período de maturação do biofilme.

Contagens das células aderidas utilizando a temperatura de 7°C foram inferiores às obtidas a 28°C, sejam no monocultivo ou no cultivo combinado de ambos os microrganismos estudados, mas não mais que um ciclo log. Tal fato mostra a capacidade de multiplicação dos microrganismos a baixas temperaturas, mesmo que sua taxa metabólica seja mais lenta.

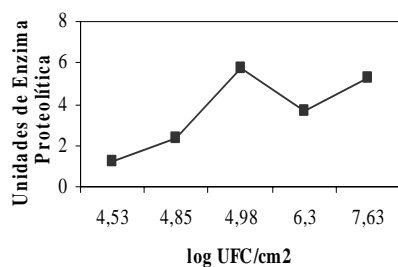
Nas condições experimentais empregadas neste estudo, a detecção de protease a partir de células aderidas nos cupons de aço inoxidável foi dependente de uma densidade populacional acima de 10^5 UFC/cm² (Figura 3).



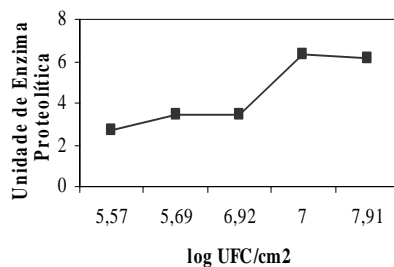
A



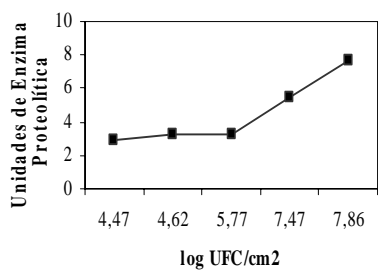
B



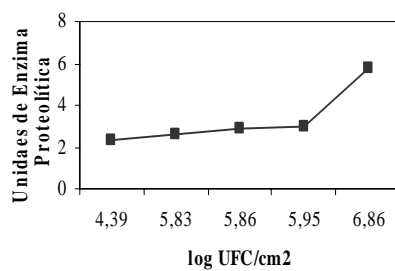
C



D



E



F

FIGURA 3: Atividade proteolítica de células aderidas de A: *Staphylococcus aureus* a 7°C; B: *Staphylococcus aureus* a 28°C; C: *Pseudomonas fluorescens* a 7°C; D: *Pseudomonas fluorescens* a 28°C; E: *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas fluorescens* a 7°C. F: *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas fluorescens* a 28°C.

A protease não foi observada em baixa densidade populacional, o que pode ser explicado pelo fato de que a produção de enzimas extracelulares pode não ser vantajosa a baixas densidades populacionais pela difusão destas e dos nutrientes liberados pela sua ação. Como a fase estacionária pode ocorrer em densidades populacionais baixas, o *quorum sensing* poderia prover um sinal mais eficiente para a ativação da produção destas enzimas do que o início da fase estacionária (MCCarthy, 2003). Observações semelhantes foram encontradas por Pinto (2005), ao avaliar o efeito do crescimento de *P. fluorescens* 07A e 041, que verificou atividade proteolítica apenas quando a cultura atingiu populações de 10^8 UFC/mL, nas temperaturas de 2°C e 4°C.

A produção de enzimas hidrolíticas extracelulares, principalmente quando a densidade populacional é alta, garante que os produtos de hidrólise estejam próximos às células e, assim, mais disponíveis para o metabolismo (Whan et al., 2000).

6 CONCLUSÕES

Houve formação de biofilme por *Pseudomonas fluorescens* no monocultivo e no cultivo combinado com *Staphylococcus aureus*. Já em *S. aureus* foi observada adesão tanto no monocultivo quanto no cultivo combinado com *P. fluorescens*. A atividade proteolítica foi observada com mais intensidade em *P. fluorescens* e pôde ser observada em contagens acima de 10^5 UFC/cm².

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, N.J.; BRIDGEMAN, T.A.; ZOTTOLA, E.A. Bacteriocidal activity of sanitizers against *Enterococcus faecium* attached to stainless steel as determined by plate count and impedance methods. **Journal of Food Protection**, v.61, n.7, p.833-838, 1998.

BOARI, C.A. **Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* sob diferentes condições de cultivo**. 2008. 80p. (Doutorado em Ciência dos Alimentos)-Universidade Federal de Lavras, MG.

BOWER, C.K.; MCGUIRE, J.; DAESCHEL, M.A. The adhesion and detachment of bacteria and spores on food-contact surfaces. **Trends in Food Science & Technology**, v.7, p.152-157, 1996.

DOGAN, B.; BOOR, K.J. Genetic diversity and spoilage potentials among *Pseudomonas* spp. isolated from fluid milk products and dairy processing plants. **Applied Environmental Microbiology**, v.69, p.130-138, 2003.

DONLAN, R.M.; COSTERTON, J.W.S. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v.15, p.167-193., 2002.

DUBIN, G.; NIEMCZYK, J.S.; KISIELEWSKA, M.; PUSTELNY, K.; POPOWICZ, G.M.; BISTA, M.; KANTYKA, T.; BOULWARE, K.T.; STENNICKES, H.R. J.; CZARNA, A.; PHOPAISARN, M.; DAUGHERTY, P.S.; THØGERSEN, I. B.; ENGHILDS, J.J.; THORNEBERRY, N.; DUBIN, A.; POTEMPA, J. Enzymatic Activity of the *Staphylococcus aureus* SpIB Serine Protease is Induced by Substrates Containing the Sequence Trp-Glu-Leu-Gln. **Molecular Biology**, v.379, p.343-356, 2008.

FUQUA, W.C.; WINANS, S.C.; GREENBERG, E.P. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. **Journal of Bacteriology**, v.176, n.2, p.269-275, 1994.

KONG, K.F.; VUONG, C.; OTTO, M. S. *Staphylococcus* quorum sensing in biofilm formation and infection. **International Journal of Medical Microbiology**, v.296, p.133-139, 2006.

KUSUMANINGRUM, H.D.; RIBOLDI, G.; HAZELEAGER, W.L.; BREUMER, R.R.. Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods. **International Journal of Food Microbiology**, v.85, p.227-236, 2003.

LINDSAY, D.; BROZEL, V.S.; MOSTERT, J.F.; VON HOLY, A. Differential efficacy of a chlorine dioxide-containing sanitizer against single species and binary biofilms of a dairy-associated *Bacillus cereus* and a *Pseudomonas fluorescens* isolate. **Journal Applied Microbiology**, v.92, p. 352–361, 2002.

LYON, G.J.; NOVICK, R.P. Peptide signaling in *Staphylococcus aureus* and other Gram-positive bacteria. **Peptides**, v.25, p.1389–1403, 2004.

MCCARTHY, C.N. **Regulatory elements controlling lipase and metalloprotease production in *Pseudomonas fluorescens* B52**. 2003. 98p. (PhD Thesis)-School of Health Science, Faculty of Health Sciences, Griffith University, Australia.

MARQUES, S.C; VALERIANO, C.; EVANGELISTA, S.R.; PICCOLI, R.H. Tanques de resfriamento de leite: processo de higienização. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, MG, v.62, n.357, p.496-501, jul./ago. 2007a. (Congresso Nacional de Laticínios, 24).

O'TOOLE, G.; KAPLAN, H. B.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. **Annual Review of Microbiology**, v.54, p.49-79, 2000.

PINTO, U.M.. **Quorum sensing em bactérias psicotróficas proteolíticas isoladas de leite**. 2005. 70p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola)-Universidade Federal de Viçosa, MG.

POMPERMAYER, D.M.C.; GAYLARDE, C.C. The influence of temperature on the adhesion of mixed cultures of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to polypropylene. **Food Microbiology**, v.17, n.4, p.361-365, 2000.

RONNER, A.B.; WONG, A.C.L. Biofilm development and sanitizer inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* on stainless steel and buna-n rubber. **Journal of Food Protection**, v.56, n.9, p.750-758, 1993.

- SAND, W. Microbial mechanisms of deterioration of inorganic substrates- a general mechanistic overview. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.40, p.2-4, p.183-190, 1997.
- SHAPIRO, J.A. Thinking about bacterial populations a multicellular organisms. **Annual Review Microbiology**, v.52, p.81-104, 1998.
- STOODLEY, P.; SAUER, K.; DAVIES, D.G.; COSTERTON, W. Biofilm as complex differentiated communities **Annual Review Microbiology**, v.56, p.187-209, 2002.
- SWIFT, S.; LYNCH, M.J.; FISH, L.; KIRKE, D.F.; TOMAS, J.M.; STEWART, G.S.; WILLIAMS, P. Quorum sensing-dependent regulation and blockade of exoprotease production in *Aeromonas hydrophila*. **Infect Immun.**, v.67, p.5192-5199, 1999.
- VALCARCE, M.B.; BUSALMEN, S.R.; SANCHÉS, R. The influence of the surface condition of the adhesion of *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 17552) to cooper and aluminium brass. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.50, p.61-66, 2002.
- VAN HOUTT, R; AERTSEN, A.; JANSEN, A.; QUINTANA, A.L.; MICHIELS, C.W. Biofilm formation and cell-to-cell signalling in Gram-negative bacteria isolated from a food processing environment. **Journal of Applied Microbiology**, v.96, p.177-484, 2003.
- ZOTOLLA, E. A.; SASAHARA, K.C. Microbial biofilms in the food processing industry- Should they be a concern? **International Journal of Food Microbiology**, v.23, p.125-148, 1994.
- WHAN, L.; DUNSTALL, G.; ROWE, M.T. A study of the growth kinetics of two pseudomonads from pasteurized milk and the possible role of *quorum sensing*. **Milchwissenschaft**, v.55, p.371-373, 2000.
- WIRTANEN, G.; HUSMARK, U.; MATTILA-SANDHOLM, T. Microbial evaluation of the biotransfer potencial from surfaces with *Bacillus* biofilms after rising and cleaning procedures in closed food-processing systems. **Journal of Food Protection**, v.59, n.7, p. 727-733, July, 1996.

CONCLUSÃO GERAL

- Foi detectada uma elevada diversidade bacteriana entre os isolados com predominância de bactérias do gênero *Pseudomonas* identificado pelo API 20NE e do gênero *Serratia* identificada pelo Bactray I e II.
- A produção de protease e lipase foi elevada entre os isolados, sendo que a atividade da lecitinase foi menos pronunciada.
- O índice de multirresistência foi observado em todos os isolados submetidos ao antibiograma.
- Foi detectada em 100% dos isolados a produção de homoserina lactona acilada.
- Houve formação de biofilme por *Pseudomonas fluorescens* no monocultivo e no cultivo combinado com *Staphylococcus aureus*. Já em *S. aureus* foi observada adesão tanto no monocultivo quanto no cultivo combinado com *P. fluorescens*.
- Contagens bacterianas na adesão e no biofilme a 28°C não foram superiores a um ciclo log das contagens obtidas a 7°C.
- A atividade proteolítica foi observada com mais intensidade em *P. fluorescens* e pôde ser observada em contagens acima de 10^5 UFC/cm².