ESTUDO DO PERFIL MICROBIANO E DA RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS DE AMOSTRAS DE LEITE DE TRANSIÇÃO BOVINO FERMENTADO

Fernanda Antunes Martins (PIBIC/FA), Ingrid Caroline da Silva, Gabrielle Marcondes, Valquiria Nanuncio Chochel, Ester de Moura Rios, Luciana da Silva Leal Karolewski (Orientadora), e-mail: lu_s_leal@yahoo.com.br

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Zootecnia.

Zootecnia/Produção Animal

Palavras-chave: aleitamento, anaerobiose, microbiologia.

Resumo

Os objetivos foram avaliar o perfil microbiano e determinar a sensibilidade aos antibióticos de enterobactérias isoladas do leite de transição bovino *in natura* e fermentado por 21, 30, 60, 90, 120 e 180 dias, coletados de dez vacas leiteiras. Foram realizadas diluições seriadas e inoculações das amostras em meios de cultura enriquecidos e seletivos. Após a quantificação, procederam-se os testes morfotintoriais, bioquímicos e o antibiograma. No D60 nenhum crescimento de enterobactérias foi identificado, enquanto que as bactérias ácido-láticas (BAL) aumentaram a partir do D21. Bactérias multirresistentes foram encontradas até o D30 e 29% das bactérias do leite de transição *in natura* apresentaram índice de resistência múltipla aos antimicrobianos (IRMA) ≥0,3. Conclui-se que com a fermentação do leite de transição as BAL mantêm-se viáveis e os patógenos reduzem durante o período de 180 dias. As bactérias multirresistentes são eliminadas com o processo fermentativo e, de maneira geral, as enterobactérias são sensíveis aos antibióticos.

Introdução

O colostro é a primeira secreção da glândula mamária pós-parto, sendo rico em proteínas, imunoglobulinas, minerais, vitaminas, sólidos totais e cinzas (ANDRADE; ANSELMI; MENDES, 2010). Nas ordenhas seguintes, o colostro passa a ser denominado leite de transição e a partir da 7ª ou 8ª ordenha se obtém o leite (SANTOS et al., 2002). O colostro é produzido em quantidades maiores do que as exigidas pelos bezerros e o excedente não é comercializado. Assim, técnicas de armazenamento vêm sendo estudadas há muitos anos e uma delas é a fermentação obtida com o armazenamento de forma anaeróbica (AZEVEDO; DUARTE, 2013).

Deste modo, o presente estudo teve como objetivos conhecer o perfil microbiano e a susceptibilidade das enterobactérias aos antimicrobianos de interesse zootécnico do leite de transição bovino *in natura* e fermentado por até 180 dias.

Material e Métodos

Foram utilizadas amostras de leite de transição de dez vacas leiteiras da raça Holandesa e *tricross* (Jersey x Holandesa x Illawarra), criadas na Fazenda Escola Capão da Onça, Ponta Grossa/PR.

Os leites de transição foram obtidos assepticamente entre o 1º e o 3º dia pós-parto, armazenados em garrafas plásticas PET de 500 mL, sem a presença de

ar, e analisados *in natura* (D0) e nos dias 21 (D21), 30 (D30), 60 (D60), 90 (D90), 120 (D120) e 180 (D180) após o envase.

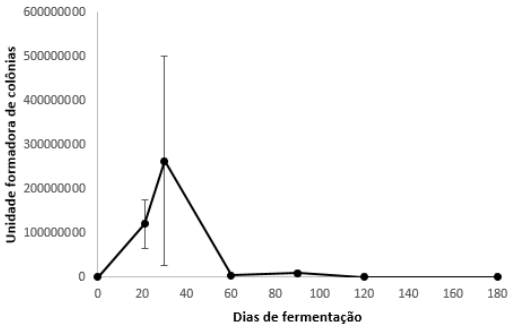
No laboratório, as amostras diluídas em série foram inoculadas nos meios de cultura: MRSA (bactérias láticas), ágar sangue (bactérias totais), ágar fungo acrescido de enrofloxacino (fungos e leveduras), ágar macconkey (enterobactérias), ágar cetrimide (*Pseudomonas*) e ágar manitol (estafilococos). Após incubação, procedeu-se a quantificação, os testes morfotintoriais, bioquímicos e o antibiograma.

Foram calculadas as médias das unidades formadoras de colônias (UFC) isoladas de cada meio de cultura. A % de enterobactérias sensíveis aos antibióticos testados foi calculada através da frequência relativa e, posteriormente, foi determinado o índice de resistência múltipla aos antimicrobianos (IRMA) para cada enterobactéria isolada conforme Krumperman (1983).

Resultados e Discussão

As contagens dos principais grupos de micro-organismos isolados do leite de transição *in natura* e fermentado estão listadas nas Figuras 1-3.

Figura 1 –Média e erro padrão das UFC de bactérias totais, em leite de transição bovino *in natura* e fermentado por 21, 30, 60, 90, 120 e 180 dias, Ponta Grossa/PR, 2019

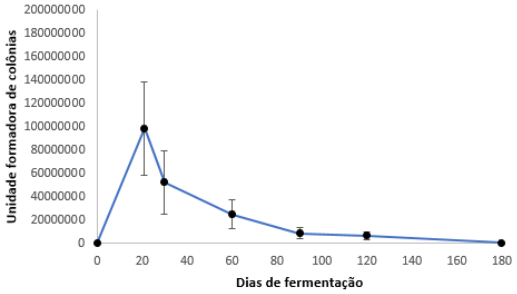


Fonte: A autora

A quantidade média de bactérias totais no leite de transição *in natura* foi de 567.810 UFC mL^{-1} (Figura 1). Com 21 dias de fermentação houve aumento nas contagens de bactérias totais, mas as mudanças também foram qualitativas. Níveis de contaminação para bactérias totais acima de 100.000 UFC mL^{-1} não são adequados para alimentação de bezerros (SANTOS et al., 2017).

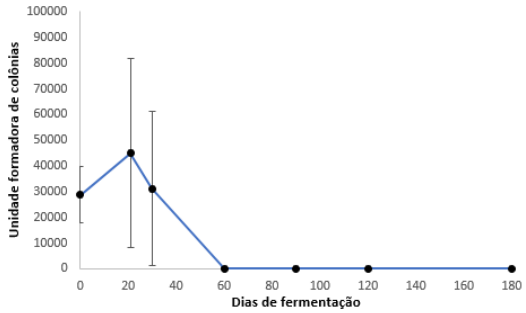
As colônias crescidas no MRSA foram isoladas e caracterizadas como bacilos ou cocos Gram-positivos, não esporulados e catalase negativos, características presuntivas para bactérias ácido láticas (BAL). Houve aumento das BAL aos 21 dias e, posteriormente, houve um declínio, possivelmente pela falta de substrato para a sua manutenção (Figura 2). As BAL são importantes agentes probióticos e antagonistas das bactérias patogênicas e, ao fermentarem a lactose do leite produzindo ácido lático, podem impedir a deterioração do produto e a transmissão de doenças e toxinas (WOUTERS, 2002).

Figura 2 – Média e erro padrão das UFC de bactérias ácido láticas, em leite de transição bovino *in natura* e fermentado por 21, 30, 60, 90, 120 e 180 dias, Ponta Grossa/PR, 2019



Fonte: A autora

Figura 3 – Média e erro padrão das UFC de enterobactérias, em leite de transição bovino *in natura* e fermentado por 21, 30, 60, 90, 120 e 180 dias, Ponta Grossa/PR, 2019



Fonte: A autora

No ágar macconkey foram isolados e caracterizados bacilos Gram-negativos e oxidase negativos. No leite de transição *in natura* foram identificadas bioquimicamente as espécies: *Enterobacter amnigenus, Escherichia coli, Citrobacter diversus, Enterobacter cloacae, Citrobacter amalonanaticus, Serratia liquefaciens e Citrobacter freundii*. Aos 21 de fermentação foram isoladas seis enterobactérias predominantes e dentre elas foram identificadas *Hafnia alvei* e *Escherichia coli*. Com 30 dias de fermentação foram isoladas *Escherichia coli, Citrobacter diversus* e *Serratia rubidaea*. Houve redução das enterobactérias apenas aos 60 dias de fermentação (Figura 3).

Com 60 dias de armazenamento não houve crescimento de leveduras, no entanto, com 90 e 180 dias de armazenamento houve crescimento de fungos filamentosos e leveduras em apenas uma das vacas, podendo se tratar de uma possível contaminação ambiental do material no decorrer da realização da análise.

No D90 e D120 foram isolados do ágar manitol *Staphylococcus aureus* e diplococos, Gram-positivos, respectivamente.

O grupo das *Pseudomonas* sp., foi eliminado com o processo fermentativo até os 120 dias, no entanto houve a identificação de bactérias deste mesmo gênero no último período de análise (D180). A presença desses micro-organismos sinaliza que o leite começou a se deteriorar (NUÑEZ; NUÑES, 1983) o que pode ocorrer em um processo fermentativo longo.

No presente trabalho, todas as enterobactérias isoladas foram sensíveis aos antibióticos de amplo espectro: fluorquinolonas (ciprofloxacino, enrofloxacino e norfloxaxino), anfenicóis (cloranfenicol) e à cefalosporina de terceira geração

ISSN 1676-0093

(ceftiofur). Alguns isolados apresentaram resistência aos inibidores de β-lactâmicos (amoxicilina/ácido clavulânico e ampicilina). A sensibilidade variável das enterobactérias frente à cefoxitina, tetraciclina (doxiciclina), aminoglicosídeos (gentamicina e amicacina), carbapenêmicos (meropenem) e sulfametoxazol/trimetoprin (sulfazotrin) foram confirmadas.

Bactérias multirresistentes foram encontradas nos tratamentos D0, D21 e D30 e 29% dos isolados do leite de transição *in natura* apresentaram IRMA ≥0,3. Isolados com IRMA ≥0,3 são considerados fonte potencial de transmissão de genes de resistência (KRUMPERMAN, 1983). As bactérias multirresistentes encontradas no leite de transição *in natura* foram a *Escherichia coli* e *Citrobacter diversus*.

Conclusões

As BAL mantém-se viáveis durante o processo fermentativo, há redução da população de patógenos, com a eliminação de bactérias patogênicas multirresistentes a partir dos 30 dias. As enterobactérias são sensíveis aos antibióticos de interesse zootécnico.

Agradecimentos

À Fundação Araucária por conceder a bolsa de Iniciação Científica e à FESCON pelo fornecimento do leite de transição e disponibilidade.

Referências

ANDRADE, E. A.; ANSELMI, R.; MENDES, C. Q. Silagem de colostro: alternativa sustentável para a bovinocultura leiteira. **SR Rural – Caderno Rural**, n. 49, p. 1, 2010.

AZEVEDO, R. A. de; DUARTE, E. R. Aspectos microbiológicos do colostro bovino em diferentes técnicas de conservação e armazenamento: uma revisão. **Revista Eletrônica de Pesquisa Animal**, v. 1, n. 2, p.84-98, 2013.

KRUMPERMAN, P. H. Multiple antibiotic resistance indexing of Escherichia coli to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. **Applied Environmental Microbiology**, v.46, n.1, p.165-170, 1983.

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

SANTOS, G. T. dos. et al. Importância do manejo e considerações econômicas na criação de bezerras e novilhas. In: SUL-LEITE: SIMPÓSIO SOBRE SUSTENTABILIDADE DA PECUÁRIA DE LEITE NA REGIÃO SUL DO BRASIL, 2, 2002, Maringá. **Anais**...Toledo: NUPEL, 2002. p. 239-267.

SANTOS, H. L. et al. Nutritional and microbiological quality of bovine colostrum samples in Brazil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 46, n. 1, p.72-79, 2017.

WOUTERS, J. T. M. et al. Microbes from raw milk for fermented dairy products. **International Dairy Journal**, v. 12, p.91-109, 2002.