

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
BACTÉRIAS PSICROTRÓFICAS GRAM-
NEGATIVAS ISOLADAS DE TANQUE DE
REFRIGERAÇÃO POR EXPANSÃO**

CAROLINA VALERIANO

2007

CAROLINA VALERIANO

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS
PSICROTÓFICAS GRAM-NEGATIVAS ISOLADAS DE
TANQUES DE REFRIGERAÇÃO POR EXPANSÃO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientador

Profa. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2007

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

Valeriano, Carolina

Identificação e Caracterização de bactérias psicrotróficas Gram-negativas isoladas de tanques de refrigeração por expansão / Carolina Valeriano. – Lavras : UFLA, 2007.

41 p. : il.

Orientadora: Roberta Hilsdorf Picolli
Dissertação (Mestrado) – UFLA.
Bibliografia.

1. Bactérias Gram-negativas. 2. Psicrotróficos. 3. Identificação. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-576.163

CAROLINA VALERIANO

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS
PSICROTÓFICAS GRAM-NEGATIVAS ISOLADAS DE
TANQUES DE REFRIGERAÇÃO POR EXPANSÃO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal
de Lavras como parte das exigências do
Programa de Pós-graduação em Microbiologia
Agrícola, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 28 de fevereiro de 2007.

Prof.. Dr. Henrique César Pereira Figueiredo UFLA

Prof. Dr. Luiz Ronaldo de Abreu UFLA

Prof. Dr. Luís Roberto Batista UFLA

Profa. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli
UFLA
(Orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

AGRADECIMENTOS

A Deus e a Irmã Benigna, por iluminar os meus caminhos.

Minha mãe, Beatriz, pelo amor, apoio, ajuda, educação, suporte e exemplo.

Meu irmão, Rodrigo, pelo amor, carinho, companheirismo e amizade.

Aos meus avós, Teresinha e Morera, e ao meu tio Reginaldo por torcerem por mim.

Ao meu namorado Carlos Henrique pelo incentivo e apoio em todos os momentos.

A minha orientadora Roberta Hilsdorf Piccoli pela orientação e ensinamentos;

À Universidade Federal de Lavras.

A Fapemig, pela concessão da bolsa de estudos;

Ao CNPq pelo financiamento do projeto.

Aos profissionais da EMATER pelo auxílio neste trabalho.

Aos responsáveis pelos tanques de expansão pela ajuda.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola pela cooperação e contribuição.

A Suzana pela amizade e auxílio durante o experimento.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Cleube, Vitor, Danilo, Maira, Danila, Gisele, Belami, Aline, Tales e Vinicius, entre outros, pelo apoio e amizade.

A Ivani, Eliane e Magda pela disposição em ajudar sempre e pela amizade.

Aos amigos André, Taís, Milagros e Gisele pelo companheirismo.

A todos que de alguma forma contribuíram para que eu alcançasse este sonho.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE TABELAS.....	i
RESUMO.....	ii
ABSTRACT.....	iii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 Qualidade do leite cru.....	3
2.2 Microrganismos Psicotróficos.....	5
2.3 Resistência a antibióticos.....	8
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
3.1 Isolamento e caracterização das cepas.....	12
3.2 Identificação.....	12
3.3 Produção de enzimas extracelulares.....	13
3.4 Avaliação da resistência a antimicrobianos.....	14
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	15
4.1 Contagem de Psicotróficos.....	15
4.2 Caracterização fenotípica	16
4.3 Produção de enzimas extracelular	19
4.4 Resistência a antibióticos	23
5 CONCLUSÕES.....	31
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1 População microbiana nos tanques de refrigeração por expansão.....	16
TABELA 2 Caracterização fenotípica e produção de enzimas extracelular de microrganismos isolados de tanques de refrigeração por expansão.....	22
TABELA 3 Perfil de múltipla resistência a antibióticos de isolados bacterianos, oriundos de tanques de refrigeração por expansão.....	28
TABELA 4 Perfil de múltipla resistência a antibióticos de isolados bacterianos, oriundos de tanques de refrigeração por expansão.....	29
TABELA 5 Perfil de múltipla resistência a antibióticos de isolados bacterianos, oriundos de tanques de refrigeração por expansão.....	29
TABELA 6 Perfil de múltipla resistência a antibióticos de isolados bacterianos, oriundos de tanques de refrigeração por expansão.....	30

RESUMO

VALERIANO, Carolina. **Identificação e Caracterização de bactérias psicrotróficas Gram-negativas isoladas de tanque de refrigeração por expansão.** 2007. 41p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.¹

O objetivo deste trabalho foi identificar a diversidade de microrganismos psicrotróficos Gram-negativos presentes em tanques de expansão comunitários, bem como avaliar a capacidade de produção de enzimas extracelulares e o perfil de resistência a antibiótico destes microrganismos. Amostras da superfície de 32 tanques de refrigeração por expansão foram coletadas com auxílio de suabe estéril; destas amostras, 60 isolados foram selecionados e identificadas com auxílio de Kits de identificação API 20NE e Bactray, sendo 27,6% não pertencentes à família Enterobacteriaceae e 67,6% pertencentes à família Enterobacteriaceae. Microrganismos como *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas fluorescens*, *Agrobacterium radiobacter*, *Serratia liquefaciens*, *Klebsiella ozaenae*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Citrobacter freundini*, *Yersinia kristenseni*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Shigella flexneri* e *Shigella dysenteriae* foram isolados a partir de tanques de expansão por refrigeração neste estudo. Todos os isolados foram avaliados com base em suas características deterioradoras, pela produção de enzimas extracelulares (proteínases, lipases e lecitinases). Este trabalho também avaliou a extensão da resistência a antibióticos entre os microrganismos isolados pelo teste de difusão em ágar utilizando 10 antibióticos, classificando os microrganismos em resistentes e susceptíveis, além de avaliar a porcentagem de multirresistência. Todos os isolados apresentaram índice MAR igual ou superior a 40%, ou seja, resistência a quatro ou mais drogas das dez testadas.

¹ Comitê orientador: Roberta Hilsdorf Picolli – UFLA (Orientadora); Luiz Ronaldo de Abreu – UFLA (Co-orientador).

ABSTRACT

VALERIANO, Carolina. **Identification and characterization of psychrotrophic Gram-negative microorganisms isolated from bulk tank milk.** 2007. 41p. Dissertation (Master Program in Agricultural Microbiology) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.¹

The aim of this research was to study the diversity of psychrotrophic Gram-negative microorganisms present in milk in communitarian bulk tank and to evaluate their capacity to produce extracellular enzymes and resistance of the isolates to antibiotics. Samples of surfaces of 32 bulk tank milk were collected with sterile swab which that 60 isolates were selected and identified using API 20NE and Bactray kit. Of that isolates 27,6% do not pertain to Enterobacteriaceae and 67,6% pertain to that family. Microorganisms such *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas fluorescens*, *Agrobacterium radiobacter*, *Serratia liquefaciens*, *Klebsiella ozaenae*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Citrobacter freundii*, *Yersinia kristenseni*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Shigella flexneri* and *Shigella dysenteriae* were isolated from the bulk tank milk. All microorganisms isolated were evaluated in function of their putative characteristics by production of extra-cellular enzymes, like proteinases, lipases and lecithinases. This research also evaluated the microbial resistance to 10 antibiotic by the test of diffusion in agar. The microorganisms were classified as resistant or susceptible besides their percentage of multiresistance. All of isolated present MAR (Multiple antibiotic resistance) index higher than 40%, meaning resistant to two or more drugs of the ten drugs studied experimentally.

¹ Guidance committee: Roberta Hilsdorf Piccoli – UFLA (Advisor); Luiz Ronaldo de Abreu – UFLA (Co-advisor).

1 INTRODUÇÃO

A implementação da estocagem do leite cru refrigerado na fonte de produção iniciou-se no Brasil na década de 90, sendo regulamentada pelo Ministério da Agricultura em 2002 (Brasil, 2002). Contudo, deve-se ter em mente que o tanque de refrigeração não é a solução definitiva para os problemas de qualidade, já que ele apenas reduz a taxa de crescimento, no leite, de bactérias mesófilas ou acidificantes e de muitos patógenos. Assim, a refrigeração do leite, por si só, não é garantia de qualidade, pois atua seletivamente, favorecendo a proliferação de microrganismos psicrófilos (Fairbairn & Law, 1986), sendo de extrema importância que o leite cru seja obtido em condições higiênico-sanitárias adequadas para diminuir a contaminação inicial. Dessa forma, a redução da temperatura possa manter a contagem microbiana em níveis baixos. (Fagundes et al., 2006).

Bactérias psicrófilas Gram-negativas são predominantes na microbiota de leite cru refrigerado, composta principalmente por espécies de *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Serratia*, *Alcaligenes*, *Chromobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Yersinia* (Martins, 2006). Apesar de a maioria destas bactérias não resistirem a tratamentos com alta temperatura aplicados ao leite em seu processamento, durante seu crescimento no leite estas produzem lipases e proteases extracelulares extremamente resistentes a altas temperaturas. A quantidade destas enzimas está relacionada com a determinação da qualidade sensorial e com a deterioração de produtos derivados do leite (Manzano et al., 2004). A atividade residual destas proteases e lipases tem sido relacionada com o baixo rendimento de queijos, a formação de off-flavours, a gelatinização de leite e a coagulação das proteínas de leite UHT durante o armazenamento (Tondo et al., 2003). Entre as hidrolases presentes no leite, as de *Pseudomonas* spp. têm sido as mais estudadas (Sorhaug e Stepaniak, 1997).

O uso de antibióticos há mais de 50 anos na medicina humana, na medicina veterinária e na agricultura tem resultado no aumento do número de bactérias comensais e patogênicas resistentes a agentes antimicrobianos (Bogaard & Stobberingh, 2000).

Agentes antimicrobianos são usados principalmente em rebanhos de gado para profilaxia e tratamento de infecções do úbere, mas também para outras infecções (Schlegelova, 2002)

O desenvolvimento da resistência a antibióticos pode ocorrer pela forma intrínseca, ou natural, a qual reflete a adaptação evolucionária da bactéria em seu ambiente, ou pela forma adquirida por mutação ou carregada por elementos genéticos móveis como plasmídeos, transposons e integrons (Witte, 2000, Salisbury, 2002; Garofalo et al., 2006).

O ecossistema bacteriano existe em diferentes níveis (ambiente, intestino humano e de animais e alimentos), nos quais rotas simples ou complexas de transferência de genes entre a população bacteriana podem ocorrer (Teale, 2002). A transferência de genes resistentes a bactérias patogênicas ou oportunistas apresenta uma séria ameaça, visto que infecções causadas por estes microrganismos não podem ser tratadas com antibióticos comuns (Phillips, et al., 2004; Garofalo et al., 2006).

O objetivo deste trabalho foi identificar a diversidade de microrganismos psicrotróficos Gram-negativos presentes em tanques de expansão comunitários, bem como avaliar a capacidade de produção de enzimas extracelulares e o perfil de resistência a antibiótico destes microrganismos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Qualidade do leite cru

A alta atividade de água, o pH moderado (6,4 – 6,6) e o amplo suprimento de nutrientes fazem do leite excelente meio para multiplicação de um grande número de microrganismos. A qualidade microbiológica do leite cru está intimamente relacionada com o grau de contaminação inicial e com o binômio tempo/temperatura em que esse permanece desde a ordenha até o processamento. Em geral, quanto maior o número de contaminantes e mais alta for a temperatura na qual o leite permanece (próxima de 30°C), menor será o seu tempo de conservação. De forma geral, a qualidade do leite está associada com a microbiota presente no produto (Mutukumira et al,1996; Xavier et al.,2000).

Pode-se dizer que a qualidade insatisfatória do leite produzido no Brasil é um problema crônico, de difícil solução, em que fatores de ordem social, econômica, cultural, e até mesmo climática, estão envolvidos, sem merecer a devida atenção no campo político, apesar do importante papel representado pelo leite na alimentação da população (Silveira, 1998). Dentre os fatores que contribuem para a baixa qualidade do leite fluido no Brasil estão aquelas relacionados com a influência das estações do ano, as práticas de produção e manejo nas fazendas, a localização geográfica, a temperatura de estocagem do leite e a distância do transporte entre a fazenda e a plataforma de recepção da indústria, que contribuem para o desenvolvimento de microrganismos contaminantes do leite (Huhn et al, 1980; Silveira et al., 1998). Além de fatores como a qualidade microbiológica das águas, a qualidade do ar dos estábulos, a sanidade dos ordenhadores e dos animais e, principalmente, os utensílios mal higienizados também contribuem de modo decisivo para o estado microbiológico do leite.

Com o objetivo de melhorar a qualidade do leite, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), considerando a necessidade de aperfeiçoamento e modernização da legislação sanitária federal sobre a produção de leite, aprovou os regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, do leite tipo B, do leite tipo C, do leite pasteurizado e do leite cru refrigerado e o regulamento técnico da coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel, pela Instrução Normativa 51 (IN 51), que entrou em vigor dia 1º de julho de 2005 (Brasil, 2002). Esta norteia o processo de coleta, transporte e identidade técnica do leite fluido, sendo um dos pontos centrais dessa instrução a obrigatoriedade do resfriamento do leite imediatamente após a ordenha, preferencialmente em tanque de expansão.

Esse documento tem como principal objetivo diminuir a deterioração microbiana, admitindo, portanto, o uso coletivo de tanques de refrigeração a granel ("tanques comunitários"), por produtores de leite, desde que baseados no princípio de operação por expansão direta. A localização do equipamento deve ser estratégica, facilitando a entrega do leite de cada ordenha no local em que o mesmo estiver instalado. Não é permitido acumular, em determinada propriedade rural, a produção de mais de uma ordenha para enviá-la uma única vez por dia aos tanques comunitários, os quais devem ser higienizados logo após a entrega do leite, pelo enxágue com água corrente e a utilização de detergentes biodegradáveis e escovas apropriadas. A capacidade do tanque de refrigeração para uso coletivo deve ser dimensionada de modo a propiciar condições mais adequadas de operacionalização do sistema, particularmente no que diz respeito à velocidade de refrigeração da matéria-prima.

Contudo, deve-se ter em mente que o tanque de refrigeração não é a solução definitiva para os problemas de qualidade, já que ele apenas reduz a taxa de crescimento de bactérias mesófilas ou acidificantes e de muitos patógenos no

leite, atuando seletivamente, favorecendo a proliferação de microrganismos psicrotróficos no leite (Fairbairn & Law, 1986).

Assim, o processo de modernização no setor leiteiro no Brasil, com significativas mudanças nos sistemas de armazenamento e transporte do leite, tem ocasionado danos à qualidade do leite por atuar de forma seletiva na proliferação de microrganismos psicrotróficos (FAIRBAIRN & LAW, 1986; SANTOS & FONSECA, 2002). Segundo Holm, (2004), a qualidade de tanques de expansão por refrigeração e equipamentos de ordenha é normalmente avaliada por parâmetros numéricos; entre eles, a contagem bacteriana total é considerada o reflexo das condições gerais de higiene na fazenda. Entretanto, a contagem de microrganismos psicrotróficos não é levada em consideração.

O suprimento de água de qualidade inadequada é considerado uma das principais fontes de contaminação de psicrotróficos em leite cru, de deficiência nos processos de higienização dos equipamentos de ordenha e armazenamento e de mastite (Eneroth et al. 2000). Portanto, cabe ressaltar que o resfriamento do leite deve estar associado, obrigatoriamente, às boas práticas de manejo e higiene na ordenha, à correta manutenção, ao dimensionamento e funcionamento do sistema de ordenha e de resfriamento, além de um programa de limpeza e sanificação apropriado dos tanques de armazenamento, equipamentos e tubulações de ordenha (Mosteller & Bishop, 1993).

2.2 Microrganismos Psicrotróficos

Bactérias psicrotróficas são ubíquas na natureza, tendo como habitat natural o solo, a água e os animais. Não constituem um grupo taxonômico específico de microrganismos e apresentam, aproximadamente, 15 gêneros diferentes isolados de leite e derivados. Estes gêneros são compostos por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, bacilos, cocos, víbrios, formadores ou não de esporos, assim como microrganismos aeróbios e anaeróbios. Alguns

gêneros de fungos filamentosos e leveduras também apresentam características do grupo de psicotróficos e podem causar danos à qualidade do leite (Cousin, 1982; Rajmohan, 2002).

As condições do leite cru durante a ordenha, o transporte e a refrigeração em tanques causam uma mudança de sua microbiota predominantemente Gran-positiva para uma microbiota predominantemente Gran-negativa, estas podendo chegar a mais de 90% da população microbiana de leite cru estocado sob refrigeração. A microbiota Gram-negativa é composta principalmente por espécies de psicotróficos como *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Serratia*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Acromobacter*, *Alcaligenes* e *Chromobacteria*, que podem ser patogênicos para animais e humanos (Garcia-Arnesto, 1997; Martins et al., 2006). Na produção leiteira os alvos mais frequentes dos microrganismos psicotróficos são a superfície dos tetos mal lavados, o úbere acometido por infecções e os equipamentos de ordenha mal higienizados. Nesse processo, a contaminação ocorre principalmente pelas tubulações de transporte do leite ordenhado, dos tanques de refrigeração e da água usada na higienização dos equipamentos de ordenha (Soares, 2004).

Bactérias psicotróficos são capazes de crescer em temperatura de refrigeração, porém apresentam crescimento ótimo em temperatura ambiente (Rowe et al.; 2003). A maioria destas bactérias não sobrevivem a tratamentos térmicos aplicados ao leite durante o processamento normal. Entretanto, durante o crescimento em leite cru, estas produzem algumas proteases e lipases extremamente resistentes a altas temperaturas (Manzano ete al., 2004). Estas enzimas podem resistir à pasteurização a 72 °C por 15s e, até mesmo, à ultra alta temperatura (UHT) (Griffith et al., 1981) A atividade residual destas enzimas pode reduzir a qualidade organoléptica e a vida de prateleira do leite e seus derivados (Cousin, 1982), sendo a produção destas enzimas extracelulares

influenciada pelas condições de cultivo, tais como ambiente e fatores nutricionais (Sorhaug and Stepaniak, 1997).

Em cepas de psicrotóxicos *P. fluorescens*, a adaptação para crescimento a baixas temperaturas inclui a diminuição na permeabilidade da membrana externa (Orange, 1994). A resposta de algumas espécies de *Pseudomonas* ao crescimento em baixas temperaturas pode ser usada para prevenir a entrada de moléculas tóxicas, tais como xenobióticos ou toxinas, que podem afetar células mais sensíveis e reter metabólitos vitais à célula. Este efeito pode ser compensado pela alta produção de enzimas extracelulares para degradar macromoléculas em unidades menores e fornecer carbono e fontes de energia (Gugi et al., 1991).

Bactérias Gram-negativas proteolíticas são predominantemente nos microrganismos responsáveis pela deterioração do leite e produtos derivados devido a sua habilidade para produzir proteases termoestáveis que atuam na hidrólise das proteínas do leite (Pinto et al., 2006). As proteínas do leite, α -lactalbumina e β -lactoglobulina, são relativamente resistentes à proteólise por enzimas presentes no leite, porém as caseínas são particularmente susceptíveis a proteases, sofrendo degradação que ocorre preferencialmente nas frações β e κ das micelas de caseína, podendo atuar também sobre a α -caseína e as proteínas do soro, levando a problemas sensoriais e físicos. O desenvolvimento de adstringência em amostras de leite cru e em amostras de leite pasteurizado ou tratado com temperatura ultra alta (UHT) armazenado tem sido associado à produção de polipeptídios pela ação de proteases, além de perda de rendimento de queijos, formação de “off-flavours”, gelatinização do leite e coagulação das proteínas de leite (UHT) durante o armazenamento (Sorhaug & Stepaniak, 1997, Tondo et al., 2003).

Algumas bactérias também secretam lecitinases e lipases que podem ter um significativo papel na deterioração destes produtos (Manzano et al., 2004).

O efeito das lipases endógenas na deterioração do alimento tem sido freqüentemente descrito, visto que elas são capazes de hidrolisar gordura, até mesmo em temperaturas muito baixas (Braun et al., 2000). Em geral, lipases têm massa molecular variando de 30 a 50kDa, e pH ótimo entre 7 e 9. A maioria delas apresenta especificidade para as posições sn-1 e sn-3 dos triacilgliceróis, e algumas hidrolisam diacilglicerol e monoacilglicerol mais rapidamente que triacilglicerol (Macrae, 1983). Braun et al. (2000) observaram a atividade de lipases de 11 organismos deterioradores em temperaturas de -2°C, 0,5°C, 2°C, 5°C e 7°C por um período de 38 dias.

A maior consequência da degradação de gordura no leite é a alteração da qualidade sensorial, devido ao excessivo nível de ácidos graxos livres produzidos, levando ao aparecimento de importantes alterações, como fortes odores e gosto amargos, rançosos, frutíferos e azedos, que podem desenvolver-se no leite quando ácidos graxos são degradados (Andrewes et al., 2006).

Sabe-se que a atividade hidrolítica da enzima extracelular (lipase, protease e lecitinase) é detectada ao fim da fase logarítmica e no começo da fase estacionária destas bactérias (Matselis & Roussis, 1998; Rajmohan, Dodd, & Waites, 2002, Pinto et al., 2006), condição na qual uma grande quantidade de células é alcançada. Segundo Shah (1994) e Manzano et al. (2004), níveis significantes de enzimas extracelulares e consequentes defeitos geralmente aparecem quando a contagem bacteriana excede 10^6 UFC/mL.

A resistência destas enzimas é tanta que qualquer tratamento aplicado para inativá-las, coerente com a imagem natural do leite, é capaz de tornar a qualidade do produto resultante inaceitável para o consumo (Rowe, 2003).

2.3 Resistência a antibióticos

Microrganismos devem sua existência à sua ancestral habilidade de adaptação e mudança. Uma infeliz consequência deste processo, porém, é o

desenvolvimento de resistência microbiana a antibióticos clínicos, agentes para preservação alimentar, e a agentes de desinfecção, que se transformam em problema dinâmico e complexo, levando ao excesso de morbidade, mortalidade, e alto custo no cenário clínico (Wolk et al.; 1996, Nashwan, 2006).

Já é aceito que o principal fator de risco para o aumento da resistência em bactérias patogênicas é o aumento do uso de antibióticos em animais e humanos. Em ambas as populações os antibióticos são usados para terapia e profilaxia de doenças infecciosas. Porém, em animais são também usados para outros propósitos, como promotores de crescimento, com o objetivo de prevenir perdas econômicas relacionadas à morte ou diminuição de produtividade como resultado de doenças. Isto tem inevitavelmente conduzido a um aparecimento e disseminação de bactérias resistentes e genes de resistências (Anthony, 2000; Snary et al., 2004).

O aparecimento da resistência bacteriana foi notado logo após o uso de antibióticos na medicina humana e veterinária, em 1940. Logo se observou que a resistência a antibióticos pode ocorrer por duas formas: intrínseca e adquirida. Resistência intrínseca, ou natural, a um antibiótico particular ou grupo de antibióticos é muito difundida entre bactérias, refletindo a adaptação evolucionária de bactérias a toxinas naturais em seu ambiente. Isto acontece devido à ausência do alvo do antibiótico na célula bacteriana, ou à não susceptibilidade desta célula, não podendo ser atingida pelo antibiótico (Salisbury, 2002). Bactérias Gram-negativas possuem espessa camada lipopolissacarídica que atua como barreira, limitando a difusão de moléculas de antibióticos dentro da célula, enquanto bactérias Gram-positivas caracteristicamente têm substâncias lipofílicas em sua parede celular que retardam a penetração de compostos antimicrobianos hidrofílicos e catiônicos (Wolk et al., 1996; Bower & Daeschel, 1999), a qual pode, também, ser devida à presença de enzimas de degradação natural. Bactérias Gram-positivas e Gram-

negativas podem produzir enzimas capazes de inibir a ação de antibióticos como penicilinas, cefalosporina e β -lactâmicos (Brooks, 1998; Bower & Daeschel, 1999).

Resistência adquirida pode ocorrer devido a uma mudança cromossomal ao acaso em uma célula bacteriana (mutação) envolvendo o gene codificador do alvo do antibiótico. Pode também ocorrer pela aquisição de um gene de resistência pela bactéria em uma transferência a partir de outro organismo. Em bactérias, genes de resistência são frequentemente encontrados em formas especializadas de DNA, tais como plasmídeos (unidades extracromossomal de DNA circular), transposons (os quais são encontrados em cromossomos ou plasmídeos) e intrgrons (segmentos especializados de DNA contendo determinantes de resistência empacotados chamados cassetes) (Mateu & Martin, 2000). Determinantes de resistência podem também ser adquiridos através de bacteriófagos (vírus que infectam bactérias) ou em DNA livre presentes no ambiente (ex. fragmentos de DNA originários de lise de outras células). Aquisição de determinantes de resistência extrínseco pode ocorrer por conjugação (contato célula - célula, ou *mating* com a transferência de material genético, usualmente na forma de plasmídeo); transposição (movimento de um transposon de um lado do DNA para outro); transdução (introdução de um gene de resistência por um bacteriófago infectante) ou transformação (incorporação de um DNA livre contendo genes de resistência).

Antibióticos são descritos ou por um amplo espectro (capazes de matar muitas bactérias com somente algumas cepas ou espécies naturalmente resistentes) ou por um estrito espectro (com varias cepas ou espécies resistentes). Na presença de antibióticos as bactérias resistentes têm uma vantagem seletiva e seus números são amplificados, enquanto bactérias susceptíveis são inibidas ou mortas (Salisbury, 2002,).

Evidências microbiológicas e clínicas mostram que bactérias resistentes ou determinantes de resistência podem ser passadas de animais para humanos não somente por contato direto, mas também via produtos de origem animal, resultando em infecções que são mais difíceis de serem tratadas (WHO 1997; Anthony, 2000). Em 1985, nos EUA, uma epidemia de *Salmonella Typhimurium* foi desencadeada por leites pasteurizados originados de laticínio contaminado. A cepa de *Salmonella* foi resistente a cinco antibióticos diferentes e resultou em aproximadamente 180 000 pessoas infectadas (Bower, 1999).

O desenvolvimento da resistência antimicrobiana nas últimas quatro décadas tem levado a uma intensificação da discussão sobre o uso prudente de agentes antimicrobianos, especialmente na medicina veterinária, na nutrição e na agricultura, sendo motivo de freqüentes discussões por vários órgãos governamentais e não-governamentais, juntamente com peritos e interessados. Na Europa, exemplos são as conferências da World Health Organization, que aconteceram em Berlim, em 1997 (WHO, 1997); Genebra, em 1998 (WHO, 1998); e o relato do Scientific Steering Committee on Antimicrobial Resistance em Brussels, em 1999 (European Commission, 1999). Estas e outras conferências têm concluído que o uso de drogas antimicrobianas e o desenvolvimento de resistência em animais e humanos são inter-relacionados e que sistemas devem ser estabelecidos para monitorar essa resistência em bactérias patogênicas e comensais (Caprioli, 2000).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Isolamento e caracterização das cepas

Amostras de 32 tanques de expansão comunitários situados em Aguanil, Esperança, Campo Belo, Candeias, Cana Verde, Coqueiral e Nepomuceno foram analisadas. Todas as amostras foram coletadas da parede dos tanques utilizando suabe estéril, em uma área de 100cm², logo após a higienização. As amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas e levadas ao laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Federal de Lavras para realização das análises. Alíquotas de 0,1ml das diluições dos suabes foram semeadas em placas de petri contendo Agar tripticase de soja (TSA) (Biolife, Italia) após diluições seriadas e incubadas a 7°C por 7 a 10 dias; uma subsequente avaliação do crescimento foi realizada pela contagem do número de colônias na placa. Os resultados foram expressos em termos de unidades formadoras de colônia (UFC).

3.2 Identificação

As colônias selecionadas com base nas características morfológicas foram purificadas por 3 sucessivas transferências para agar TSA e submetidas a teste de coloração de Gram, catalase, oxidase e prova de oxidação-fermentação (OF) e à identificação a nível de espécie com auxílio de kits de identificação rápida API 20NE (Biomériex, Brasil) e Bactray 1 e 2 (Laborclin, Brasil).

As amostras avaliadas como Gram-negativas, oxidase positiva e apresentando metabolismo oxidativo e fermentativo foram inoculadas em NACL 0,85%; a turbidez foi padronizada para 0,5 na escala de McFarland (BioMériex, França). Os inóculos foram distribuídos nas galerias do API 20NE, sendo incubados a 28°C e lidos após 24 e 48 horas, seguindo as normas do manual de

instrução. Os resultados foram avaliados através do manual API 20 NE (sexta ed.).

Os isolados classificados como Gram-negativos, oxidase negativa e apresentando metabolismo fermentativo foram inoculados em tubos contendo NaCl 0,85%; a turbidez foi padronizada a 0,5 na escala de McFarland. Os inóculos foram distribuídos nas galerias do Bactray 1 e 2, sendo incubados a 28°C por 24 horas. Os procedimentos para leitura foram realizados de acordo com o manual de instruções, e os resultados foram avaliados com auxílio do software Bactray.

3.3 Produção de enzimas extracelulares

A produção de enzimas extracelulares foi avaliada pelo teste de difusão em agar, em cepas identificadas anteriormente pelos kits de identificação rápida API 20NE e Bactray 1 e 2.

Proteases: A produção de enzimas extracelulares proteolíticas foi determinada em meio agar leite (Difco, França), suplementado com 5% de leite em pó; as placas foram incubadas a 25°C por 3 dias (Dogan & Boor, 2003; Alatossava & Alatossava, 2005). A atividade proteolítica foi avaliada pela formação de halos claros ao redor das colônias.

Lipases: a atividade da lipase extracelular foi avaliada em Tributirina como substrato. Este agar consiste de agar base tributirina (Himedia, Índia) suplementado com 2,0% de tributyrin (Himedia, Índia), adicionado de solução de azul de metileno. As placas foram incubadas a 25°C, por 3 a 10 dias (Braun et al., 2001; Alatossava & Alatossava, 2005). A lipólise foi observada pela formação de uma zona clara ao redor da colônia.

Lecitinases: A detecção de fosfolipases (lecitinases) foi determinada em agar TSA, suplementado com 10% de emulsão de gema de ovo, incubado a 25°C por 3 dias (Dogan & Boor, 2003; Alatossava & Alatossava, 2005). A atividade

das lecitinasas foi detectada pela formação de uma zona opaca ao redor das colônias.

3.4 Avaliação da resistência a antibióticos

Para teste de susceptibilidade e resistência dos isolados foram selecionados 10 antibióticos, abrangendo diferentes grupos químicos e funcionais, sendo os nomes e concentrações presentes nos discos os seguintes: gentamicina 10µg, Cloranfenicol 30 µg, eritromicina 15 µg, Ampicilina 10 µg, estreptomicina 10 µg, norfloxacinina 10 µg, novobiocina 30 µg, Cefuroxima 30 µg, tetraciclina 30 µg e Lincomicina 2 µg. Os cartuchos com discos de papel contendo as concentrações adequadas de cada antibiótico foram adquiridos pela Bioanalyse Brasil. A susceptibilidade aos antibióticos foi determinada pelo método de difusão dos discos. Os isolados foram inoculados em placas de petri contendo agar Mueller-Hinton (Biolife, Italia) e, posteriormente, foram adicionados os discos contendo os antibióticos, incubando a 30°C por 24 horas. Os resultados foram avaliados pela formação do halo de inibição medido em milímetros. Os isolados foram classificados como resistentes 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. O índice MAR acima de 0,2 indica multirresistência (Krumperman, 1983, Hirsch et al., 2006).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Contagem de Psicotróficos

Os resultados da contagem de microrganismos psicotróficos em tanques de expansão por refrigeração são apresentados na Tabela 1. Os resultados variaram entre $3,0 \times 10^2$ e $1,9 \times 10^7$ UFC/cm² e sugerem que, em algumas propriedades, as práticas higiênicas adotadas não garantiram uma baixa contaminação do leite armazenado sob refrigeração. Os valores observados indicam, na maioria dos casos, um processo de adesão bacteriana. Segundo Zottola (1994), para ser considerado um biofilme, o número de células aderidas deve estar entre 10^6 e 10^7 UFC/cm². Deve-se ressaltar que os processos de adesão ocorrem, provavelmente, com uma frequência maior em superfícies em contato com alimento, quando comparados à formação de biofilme. No entanto, a adesão bacteriana é relevante no procedimento de higienização de equipamentos e utensílios utilizados na produção de leite, considerando que o número elevado de microrganismos nas superfícies dificulta a ação de detergentes e sanificantes. Inclusive, já é bem estabelecido que as células aderidas apresentam maior resistência à ação dos agentes de higienização (Andrade, 1998).

TABELA 1 População microbiana nos tanques de refrigeração por expansão

<i>Tanque</i>	<i>UFC/cm²</i>
CV	2,6 x 10 ⁶
CB	1,7 x 10 ⁴
CB	1,4 x 10 ⁶
CQ	1,9 x 10 ⁷
CQ	7,2x 10 ⁶
CQ	8,3 x 10 ⁴
CQ	14 x 10 ³
CQ	< 10 ¹
CQ	4,5 x 10 ⁴
CQ	3,4 x 10 ²
BE	1,3 x 10 ⁴
BE	3,2 x 10 ⁵
BE	1,5 x 10 ³
BE	6,3 x 10 ⁶
BE	5,0 x 10 ⁴
BE	3,1 x 10 ²
BE	3,0 x 10 ²
BE	7,7 x 10 ²
BE	3,4 x 10 ²
BE	< 10 ¹
CA	< 10 ¹
CA	< 10 ¹
N	< 10 ¹
N	< 10 ¹

Legenda: CV: Cana Verde; CB: Campo Belo; BE: Boa Esperança; CQ: Coqueiral; CA: Candeias; A: Aguanil; CA: Candeias; N: Nepomuceno

4.2 Caracterização Fenotípica

Dos 25 isolados Gram-negativos, oxidase positiva, que apresentaram metabolismo oxidativo e fermentativo, obtidos a partir de tanques de expansão comunitários analisados em API 20NE, 18 (72%) foram passíveis de identificação. Dentre estes, *Aeromonas hydrophila/caviae* (10) teve maior prevalência, seguido por *Pseudomonas fluorescens* (6) e *Agrobacterium*

radiobacter (2), como apresentado na Tabela (2). Sete amostras bacterianas isoladas de tanques de refrigeração por expansão não foram identificadas nem em nível de gênero.

Aeromonas hydrophila/caviae representou 55,5% dos isolados identificados. Segundo Yucel et al. (2005), *Aeromonas* spp. apresenta capacidade de se desenvolver em alimentos armazenados entre -2 e 10°C. Em outros estudos, *Aeromonas* hidrofílica presente em leite cru aumentou significativamente ($< 10^1$ para 10^5 UFC/mL) durante a estocagem do leite a 5°C por 7 dias. Esta apresenta maior prevalência em ecossistemas aquáticos (Hirsch, 2006), o que pode relacionar a alta contaminação encontrada neste estudo com a utilização de água contaminada para higienização de tanques de expansão e equipamentos utilizados na ordenha. *Pseudomonas fluorescens* representou 33,3% dos isolados identificados.

Eneroth et al. (1998), em seu trabalho, observaram a presença de *Pseudomonas* como dominante da microbiota deterioradora em todas as amostras de leite analisadas coletadas em plantas de laticínios na Noruega. Esta prevalência pode ser explicada pelo fato de esse ser um microrganismo psicrotrófico que apresenta pequeno tempo de geração em temperaturas de 0 a 7°C (Shorhaug & Stepaniak, 1997). Além disso, essa bactéria apresenta a habilidade de produzir exopolissacarídeos, o que facilita a formação de biofilme em superfícies de equipamentos como as de tanques de expansão, tornando, assim, a bactéria mais resistente aos sanificantes e produtos químicos (Jayarao & Wang 1999) e dificultando sua eliminação.

Das 41 bactérias psicrotróficas Gram-negativas, oxidase negativa, que apresentaram metabolismo fermentativo, analisadas em kits de identificação Bactray, 100% foram identificadas em nível de espécie, conforme indicado na tabela (1), sendo elas *Yersinia Kristensenni* (1), *Yersinia pseudotuberculosis* (1), *Klebsiella ozaenae* (14), *Stenotrophomonas maltophilia* (1), *Serratia*

liquefaciens (18), *Serratia plymutica* (1) *Citrobacter freundini* (1) *Shigella flexineri* (3) e *Shigella dysinteride* (2) (Tabela 2). A presença de Enterobacterias em alimentos crus é geralmente associada à contaminação direta de alimentos com material fecal, embora se saiba que alguns destes microrganismos estão presentes em outros ambientes naturais (solo e vegetais). Destes isolados, *Serratia liquefaciens* teve predominância (43%), o que pode ser explicado por este ser um microrganismo ubíquo em ambientes como solo, ar e água; *Serratia sp.* é freqüentemente associada com alimentos crus e relacionada à deterioração de vários alimentos de origem animal (Van Houdt et al. , 2006).

Klebsiella, *Yersinia* e *Citrobacter* representaram 31,8, 0,5, e 2,2%, respectivamente, dos isolados pertencentes à família das Enterobacteriaceae. As possíveis fontes de contaminação por *Klebsiella* são vacas acometidas por mastite ou ambientes de produção mal higienizados (pessoal, utensílios e equipamentos, transporte, estocagem) (El-Sukhon, 2003). A relação entre estas enterobacterias e casos de mastite em animais tem sido relatada em alguns trabalhos. *E. coli*, *Klebsiella spp.*, *Serratia spp.* e *Enterobacter spp.* foram isoladas de glândulas mamárias acometidas por mastite (Todhunter et al. 1991), sendo que as infecções causadas por *Serratia spp.* e *Klebsiella spp.* tiveram maior duração que as infecções causadas por *E. coli*, que duraram menos que 28 dias. Estas bactérias originadas de vacas com mastite subclínica ou mastite clínica (úbere infeccionado) podem estar presentes em tanques de refrigeração por expansão (Holm et al., 2004).

Segundo Oliveira et al. (2006), a mosca doméstica apresentou elevada freqüência de *Citrobacter*, *Klebsiella* e *Enterobacter sp.* na superfície do corpo. *Yersinia pseudotuberculosis* pode ser carregada no trato digestivo de moscas domésticas adultas por 36 horas após a exposição inicial (Zurek et al., 2001). Zurek et al. (2001) relataram que fezes frescas, além de atrair elevado número de espécies de dípteros, são consideradas um meio em que o desenvolvimento

larval pode completar-se mais rapidamente. Assim, a localização de tanques de refrigeração por expansão em galpões próximos a estábulos e pocilgas sem telas de proteção pode favorecer a contaminação por moscas.

È importante enfatizar a presença de *Shiguella* em 9,7% das amostras identificadas. As bactérias do gênero *Shigella* são responsáveis pela doença conhecida como shigelose ou disenteria bacilar, uma doença em que mais da metade de todas as infecções ocorre em crianças de 1 a 10 anos de idade. Estudos epidemiológicos freqüentemente associam sua presença em alimentos pela contaminação por manipuladores e água contaminada com material fecal (Zaika & Philips, 2004), indicadores de precária higienização durante a manipulação de alimentos. A fonte de preocupação sobre a presença desta bactéria no leite é que este alimento é a principal fonte de alimentação de crianças.

Os microrganismos identificados neste trabalho já têm sido relatados em trabalhos anteriores (Alatossava & Alatossava, 2006; Jayrao & Wang, 1999), sendo estes provenientes de água, solo, vegetação, úbere e espécies clínicas presentes em humanos. Thomas & Thomas (1973) consideraram que o leite produzido em condições sanitárias inadequadas pode apresentar freqüência de microrganismos psicrotróficos superior a 75% da microbiota total do leite cru, em que 10% a 50% desta microbiota total são provenientes de equipamentos de ordenha e armazenamento higienizados inadequadamente. Santana et al. (2001) demonstraram que as principais fontes de contaminações de psicrotróficos são tetos mal higienizados, equipamentos e tubulações mal higienizados e água residual dos equipamentos, sendo que os tanques de expansão foram um dos principais pontos de contaminação, tanto pelas altas contagens como pelo volume de água residual, que apresentou contagens de $2,6 \times 10^7$ psicrotróficos /ml.

4.3 Produção de enzimas extracelular:

Os isolados identificados neste estudo foram avaliados com base em suas características deterioradoras. Considerando a atividade enzimática, avaliada em temperaturas de 25°C por teste de difusão em agar, os resultados são apresentados na Tabela (2). Embora variações sejam aparentes, os isolados apresentaram alta atividade proteolítica; um total de 96% dos isolados testados produziu proteases. A atividade lipolítica entre os isolados foi menos comum do que a proteolítica, sendo apresentada por 65% dos isolados. A produção de lecitinase foi pouco observada, sendo produzida apenas por *Pseudomonas fluorescens*, que representa 10% dos isolados. As proteases foram produzidas por todos os isolados, com exceção de *Y. pseudotuberculosis* e *S. dysenteride*. E as lecitinases foram produzidas apenas por *P. fluorescens*. As enzimas lipases foram produzidas pelos isolados *A. hidrofila* e *P. fluorescens*, *S. maltophila*, *S. liquefaciens* e *C. frundini*. Uma baixa produção da enzima lecitinase foi observada, sendo aparente apenas nos isolados do gênero *Pseudomonas*. A produção de proteases, lipases e lecitinases por *P. fluorescens* isoladas de leite bovino tem sido freqüentemente estudada (Alatossava & Alatossava, 2005).

Wiedmann et al. (1999), ao avaliarem a produção de enzimas extracelulares por vários grupos de *Pseudomonas* spp., observaram que *P. fluorescens* apresentaram alta freqüência de atividade de lipase, protease e lecitinas. Braum et al. (2001) descrevem a produção de lipases por espécies de *Pseudomonas* e *Aeromonas* que exibem atividade lipolítica durante a estocagem a temperaturas de refrigeração. Koka & Weimer (2000) caracterizaram proteases produzidas por cepas de *Pseudomonas fluorescens*, sendo estas proteases ativas entre 15 a 55°C, e pH 4.5 a 9,0, além de se apresentarem estáveis durante a pasteurização. Estas proteases e lipases resistem a temperaturas de pasteurização e, até mesmo, a tratamentos com ultra altas temperaturas (UHT), levando a conseqüentes defeitos em leite e derivados (Rajmohan et al., 2002). Segundo

Sorhaug & Stepaniak (1997), cepas de *Pseudomonas* spp. podem produzir proteinases suficientes para hidrolisar todas as micelas de caseína disponíveis em peptídeos solúveis. Tondo (2004), estudando a atividade proteolítica de *K. oxytoca*, observou, após 20h de cultivo alta atividade proteolítica, pico da atividade ocorrendo após 4h, seguida por uma diminuição de sua detecção e posterior aumento após as 16h de cultivo, quando a máxima atividade foi observada.

Relatos que descrevem purificação e caracterização de enzimas extracelular são focados principalmente em enzimas secretadas por espécies de *Pseudomonas*. Relativamente poucos estudos são realizados com enzimas secretadas por outros gêneros (Alichanidis, 1988). Al – Saleh & Zahran (1999) avaliaram a síntese de lipase por *P. fluorescens* em leite de camelo. Estas enzimas foram produzidas em amplo alcance de pH, e temperatura máxima de 25°C. Os autores observaram, também, que as enzimas produzidas apresentavam-se similares às originárias de fontes bovinas. Informações de lipase extracelular produzida por espécies de *Serratia* são particularmente limitadas, embora algumas cepas tenham sido isoladas de leite. Adham (2003) detectou a atividade lipolítica de *S. marcescens* após 6h de cultivo em temperatura de 30°C e após 12horas de cultivo a 6°C.

A produção de proteases, lipases e lecitinases, segundo Schokker & Vam Boekel (1997), acontece durante a fase exponencial e antes da fase estacionária, paralela com o crescimento, o que torna a higiene, em todos os aspectos de manipulação do leite, a principal precaução para conter a contaminação e assegurar a qualidade do leite (Sorhaug & Stepaniak, 1997), que deve estar associada com rígida manutenção da refrigeração a 4°C, minimização do tempo de estocagem do leite cru, e satisfatório método para matar ou remover microrganismos. Subseqüentemente, a identificação e caracterização de

microrganismos proteolíticos e lipolíticos e suas respectivas enzimas podem ser importante passo para assegurar a qualidade do leite e produtos lácteos.

TABELA 2 Caracterização fenotípica e produção de enzimas extracelulares de microrganismos isolados de tanques de refrigeração por expansão.

Amostra	Ident.	Lipase	Protease	Lecitinase
CV	<i>Y. pseudotuberculosis</i>	-	-	-
CB	<i>Y. Kristensenni</i>	-	+	-
BE	<i>S. Dysenteride</i>	-	-	-
CQ	<i>S. Flexneri</i>	-	+	-
CQ	<i>S. Flexneri</i>	-	+	-
BE	<i>S. Flexneri</i>	-	+	-
CV	<i>S. dysinteride</i>	-	-	-
BE	<i>K. ozaenae</i>	-	+	-
BE	<i>K. ozaenae</i>	-	+	-
CQ	<i>K. ozaenae</i>	-	+	-
CQ	<i>K. ozaenae</i>	-	+	-
BE	<i>K. ozaenae</i>	-	+	-
BE	<i>K. ozaenae</i>	-	+	-
CQ	<i>K. ozaenae</i>	-	+	-
BE	<i>K. ozaenae</i>	-	+	-
BE	<i>K. ozaenae</i>	-	+	-
BE	<i>K. ozaenae</i>	-	+	-
BE	<i>K. ozaenae</i>	-	+	-
BE	<i>K. ozaenae</i>	-	+	-
BE	<i>K. ozaenae</i>	-	+	-
BE	<i>K. ozaenae</i>	-	+	-
BE	<i>K. ozaenae</i>	-	+	-
BE	<i>K. ozaenae</i>	-	+	-
BE	<i>S. liquefaciens</i>	+	+	-
CQ	<i>S. liquefaciens</i>	+	+	-
CB	<i>S. liquefaciens</i>	+	+	-
BE	<i>S. liquefaciens</i>	+	+	-
BE	<i>S. liquefaciens</i>	+	+	-
CB	<i>S. liquefaciens</i>	+	+	-
BE	<i>S. liquefaciens</i>	+	+	-
CQ	<i>S. liquefaciens</i>	+	+	-
BE	<i>S. plymuthica</i>	+	+	-
BE	<i>S. liquefaciens</i>	+	+	-
CQ	<i>S. liquefaciens</i>	+	+	-
BE	<i>S. liquefaciens</i>	+	+	-
BE	<i>S. liquefaciens</i>	+	+	-

continua...

Tabela 2, cont.

CB	<i>S. liquefaciens</i>	+	+	-
BES	<i>S. liquefaciens</i>	+	+	-
CQ	<i>S. liquefaciens</i>	+	+	-
BE	<i>S. liquefaciens</i>	+	+	-
BE	<i>S. liquefaciens</i>	+	+	-
BE	<i>S. liquefaciens</i>	+	+	-
BE	<i>C. frundini</i>	+	+	-
BE	<i>A. hidrophila/caviae</i> .	+	+	-
BE	<i>A. hidrophila/caviae</i>	+	+	-
BE	<i>A. hidrophila/caviae</i>	+	+	-
BE	<i>A. hidrophila/caviae</i>	+	+	-
BE	<i>A. hidrophila/caviae</i>	+	+	-
BE	<i>A. hidrophila/caviae</i>	+	+	-
BE	<i>A. hidrophila/caviae</i>	+	+	-
BE	<i>A. hidrophila/caviae</i>	+	+	-
BE	<i>A. hidrophila/caviae</i>	+	+	-
BE	<i>A. hidrophila/caviae</i>	+	+	-
BE	<i>A. hidrophila/caviae</i>	+	+	-
BE	<i>P. fluorescens</i>	+	+	+
CB	<i>P. fluorescens</i>	+	+	+
CQ	<i>P. fluorescens</i>	+	+	+
BE	<i>P. fluorescens</i>	+	+	+
CB	<i>P. fluorescens</i>	+	+	+
CQ	<i>P. fluorescens</i>	+	+	+
BE	<i>A. radiobacter</i>	+	+	-
BE	<i>A. radiobacter</i>	+	+	-
BE	<i>S. maltophilia</i>	+	+	-

Legenda: CV: Cana Verde; CB: Campo Belo; BE: Boa Esperança; CQ: Coqueiral; CA: Candeias; A: Aguanil.

4.4 Resistência a antibióticos

Isolados identificados como *S. liquefaciens*, *S. plymuthica*, *Klebsiella ozaenae*, *C. freundini*, *S. dysinteride*, *s. flexineri*, *Y. pseudotuberculosis* e *Y. kristensenni* apresentaram alta resistência a AM e CXM, E, L, NV e TE, sendo que alguns isolados apresentaram resistência a norfloxacin e outros apresentaram susceptibilidade. A presença de resistência neste estudo demonstra que as enterobactérias são resistentes a vários agentes antimicrobianos, indicando alcance de diferentes mecanismos de resistência. Stock et al. (2005)

avaliaram a resistência de 104 cepas de *Serratia sp.* e observaram, com poucas exceções, que todas as espécies testadas foram uniformemente resistentes a penicilina G, oxacilina, cefalozin e cefuroxima; a todos os macrolídeos testados e aos glicopeptídeos, e foram naturalmente sensíveis a alguns aminoglicosídeos e fluoroquinolonas.

A produção de beta-lactamases é o principal mecanismo de resistência das bactérias Gram-negativas aos beta-lactâmicos, visto que a natural resistência a beta-lactâmicos por espécies de enterobactérias é predominantemente atribuída à expressão cromossômica (Stok et al., 2005).

Embora a resistência a quinolonas resulte principalmente de mutações cromossomais em enterobactérias mutantes, esta pode, também, ser mediada por plasmídeos que codificam *Qnr* proteínas, as quais protegem o DNA, ligando-se a quinolonas e comprometendo sua eficácia (Nordman & Poirel, 2005). Estes plasmídeos carregam outros genes de resistência a antibióticos, conferindo resistência a um amplo espectro de cefalosporina, aminoglicosídeos, cloranfenicol, rifampicina, sulfonamidas, tetraciclina e trimetropim (Mammeri et al., 2005).

As espécies de *Aeromonas hydrophila* apresentaram resistência a β -lactâmicos, além de apresentarem resistência a eritromicina, estreptomicina, cloranfenicol, cefuroxime, lincomicina, novobiocina e tetraciclina. A elevada resistência a eritromicina e tetraciclina está de acordo com a citada na literatura (Radu et al., 2003; Jacobs & Chenia, 2006). Costa & Cyrino (2006) avaliaram a resistência de *Aeromonas hydrophila* isolados de *Piaractus mesopotamicus* (pacu) e *Oreochromis niloticus* (Tilapia) e demonstraram a resistência de todos os isolados a amoxicilina, ampicilina, lincomicina, novobiocina, oxacilina, penicilina e trimetropim + sulfametoxazol, além de apresentarem uma resistência intermediária frente a eritromicina. Hirsch et al. (2005), ao avaliarem o perfil de resistência de espécies de *Aeromonas*, observaram que 93% dos

isolados foram resistentes à eritromicina, 36% à tetraciclina, 13% ao ac. Nalidíxico, 9% à gentamicina, 8% à nitrofurantoína, 8% à canamicina, 5% à norfloxacina, 4% ao cloranfenicol e 3% às sulfonamidas.

Ainda não há consenso na literatura a respeito da origem da resistência a diferentes antimicrobianos entre espécies de *Aeromonas*. Sabe-se que a resistência aos β -lactâmicos, como ampicilina e penicilina, é cromossômica, devido à ocorrência de produção de β -lactamases, assim como aquela às quinolonas, como norflaxacina (Ko, et al., 1996). A resistência a múltiplas drogas em *Aeromonas hydrophila* já foi relatada anteriormente. Em vários casos, transferências de plasmídeos R foram detectadas em cepas de *A. hidrófila* resistentes a drogas (Saha & Pal, 2002)

Todos os isolados de *Pseudomonas fluorescens* apresentaram resistência a AM, CXM, C, E, L, NOR, NV e TE. Anteriormente a resistência em *Pseudomonas* sp. era associada à alta impermeabilidade na membrana externa, porém esta propriedade é agora reconhecida por resultar do sinergismo entre drogas amplamente específicas do sistema de efluxo associado à baixa permeabilidade da membrana externa. Um destes sistemas de efluxo codificado pelo operom *mexAB-oprM* atua conferindo resistência a vários antibióticos, incluindo tetraciclina, cloranfenicol, quinolonas, novobiocina, macrolídeos, trimetropinae, aparentemente beta-lactâmicos e inibidores de beta-lactamases (Leclercq et al., 1999).

Stenotrphomonas maltophilia apresentou resistência a 9 dos antibióticos testados, sendo susceptível apenas a cloranfenicol. Este microrganismo é caracterizado por resistência intrínseca a várias classes de antibióticos, limitando, assim, as opções terapêuticas para o tratamento de infecções causadas por este microrganismo (Nicodemo et al., 2003). Alonso et al. (2000) apresentaram evidências de que *S. maltophilia* tem adquirido um conjunto de genes de resistência a antibióticos e metais pesados a partir de bactérias Gram-

negativas, sendo levantada a hipótese de que a transferência destes determinantes de resistência pode ter ocorrido entre *S. maltophilia* e bactérias Gram-positivas presentes no mesmo ambiente.

Dos 39 isolados representados por *S. liquefaciens*, *S. plymuthica*, *Klebsiella ozaenae*, *C. freundii*, *S. dysinteride*, *s. flexineri*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. kristensenni* e *S. maltophilia*, 32 (76,1%) e 18 (42,8%) apresentaram, respectivamente, susceptibilidade a antibióticos pertencentes à classe dos aminoglicosídeos, sendo eles estreptomocina e gentamicina. Os isolados da espécie *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas fluorescens* e *Agrobacterium radiobacter* também apresentaram susceptibilidade a pelo menos um dos antibióticos desta classe, sendo que, dos 10 isolados da espécie *Aeromonas hidrófila*, 9 apresentaram susceptibilidade a gentamicina. Já para *Pseudomomas fluorescens*, dos 6 isolados, 3 apresentaram susceptibilidade a gentamicina e 2, a estreptomocina. *Aeromonas hidrófila* apresentou, ainda, susceptibilidade a norfloxacina, e as enterobactérias apresentaram, também, alta susceptibilidade a cloranfenicol. Alatosava & Alatososa (2006) avaliaram a resistência a antibióticos entre bactérias psicrotróficas isoladas de leite cru na Finlândia e observaram que os isolados apresentaram maior susceptibilidade a antibióticos pertencentes às classes dos aminoglicosídeos e quinolonas.

O mecanismo de resistência a aminoglicosídeos pode ser expresso em alguns níveis: O baixo nível de resistência, que é comum em *Pseudomonas aeruginosa*, usualmente resulta da diminuição da eliminação da droga, provavelmente devido à impermeabilização da membrana, o que pode ser justificativa para a baixa resistência a aminoglicosídeos apresentada pelos microrganismos neste trabalho. Os altos níveis de resistência envolvem modificações químicas das moléculas por enzimas, as quais representam as principais causas de resistência a estes antimicrobianos, embora outros mecanismos tenham sido relatados (Ferrara, 2006, Leclercq et al., 1999)

Segundo Takeuchi et al. (2005) e Zhao et al. (2003), a resistência mediada por elementos genéticos móveis, como plasmídeos e transposons conjugativos, é muito comum para β -lactâmicos, macrolídeos e aminoglicosídeos, o que possibilita a transferência de genes bacterianos de resistência a ampicilina, eritromicina e cefuroxima entre os microrganismos presentes em tanques de refrigeração por expansão.

Os dados das Tabelas 3, 4 e 5 representam os perfis de múltipla resistência aos antibióticos testados dos isolados bacterianos oriundos de tanques de refrigeração por expansão. Os dados demonstram a presença de uma diversidade microbiana nos tanques de refrigeração por expansão amostrados, devido às diferenças entre os perfis de resistência apresentados por microrganismos de mesma espécie.

Todos os isolados apresentaram resistência semelhante, com média do índice MAR = 0,75. Como demonstrado na Tabela 6, dos 60 isolados, todos apresentaram o índice de resistência a múltiplos antimicrobianos (MAR) igual ou superior a 40%, ou seja, resistência a 4 ou mais drogas das dez drogas testadas. Foram obtidos 1 isolado com índice Mar de 40%, 4 isolados com índice MAR de 50%, 2 isolados com 60%, 14 isolados com 70%, 26 com 80% e 13 com 90%.

O alto número de resistência apresentado no trabalho pode ser justificado pela grande variedade de isolados presentes na amostra. Segundo Pitkala et al. (2001), a troca de fatores de resistência é maior em um ambiente com uma maior carga microbiana, como intestino e estábulos. A múltipla resistência a antibióticos (MAR) também é alta em ambientes em que há um constante uso de drogas (Vivekanandhan et al., 2002).

O uso inadequado de antimicrobianos em animais com objetivo de profilaxia, tratamento de doenças ou como promotores de crescimento pode levar a um aumento da prevalência de resistência das bactérias em animais,

transferência de patógenos resistentes a humanos pelo contato direto com animal ou via alimento ou água contaminada, além da transferência de genes resistentes para bactérias humanas (WHO, 1997). Os mecanismos para controlar a emergência de resistência de microrganismos vão do óbvio (melhora nas práticas de higiene em hospitais e fazendas), ao fantástico (desenvolvimento de antibióticos sintéticos, cujo modo de ação não pode ser derrotado pela mutação bacteriana). Porém, talvez a principal estratégia proposta para diminuir a resistência a antimicrobianos por bactérias seja a mudança na prática do uso de antibióticos (Bower & Daeschel, 1999).

TABELA 3 Perfil de múltipla resistência a antibióticos de isolados bacterianos, oriundos de tanques de refrigeração por expansão.

Perfil de múltipla resistência	Microrganismo
	<i>Serratia Liquefaciens</i>
AM, CXM, E, L, NV, TE	1
AM, CXM, E, L, NOR, NV, TE	2
AM, CXM, E, L, NV, S, TE	3
AM, CXM, C, E, L, NOR, NV, TE	3
AM, CXM, E, L, NOR, NV, S, TE	2
AM, CXM, C, E, L, NV, S, TE	2
AM, CXM, E, GN, L, NV, S, TE	1
AM, CXM, E, GN, L, NOR, NV, S, TE,	2
AM, CXM, C, E, GN, L, NV, S, TE	1
AM, CXM, C, E, L, NOR, NV, S, TE	1
TOTAL	18

Legenda: Antibióticos testados: Ampicilina (AM), Cefuroxima (CXM), Cloranfenicol (C), Eritromicina (E), Gentamicina (GN), Lincomicina (L), Norfloxacina (NOR), Novobiocina (NV), Estreptomicina (S), Tetraciclina (TE).

TABELA 4 Perfil de múltipla resistência a antibióticos de isolados bacterianos, oriundos de tanques de refrigeração por expansão.

Perfil de múltipla resistência	Microrganismo
	<i>Klebsiella ozaenae</i>
E, L, S, TE	1
CXM, E, L, NV, TE	1
AM, CXM, E, L, NV	1
AM, CXM, C, E, L, S, TE,	1
AM, CXM, E, GN, L, NV, TE	1
AM, CXM, C, E, L, NV, TE	1
AM, CXM, C, E, L, NV, S, TE	2
AM, CXM, E, GN, L, NV, S, TE	2
AM, CXM, C, E, GN, L, NV, TE	1
AM, CXM, C, L, NOR, NV, S, TE	1
AM CXM, C, E, L, NOR, NV, TE	1
AM, CXM, E, GN, L, NOR, NV, TE	1
TOTAL	14

Legenda: Antibióticos testados: Ampicilina (AM), Cefuroxima (CXM), Cloranfenicol (C) Eritromicina (E), Gentamicina (GN), Lincomicina (L), Norfloxacina (NOR), Novobiocina (NV), Estreptomicina (S), Tetraciclina (TE).

TABELA 5 Perfil de múltipla resistência a antibióticos de isolados bacterianos, oriundos de tanques de refrigeração por expansão.

Perfil de múltipla resistência	Microrganismo
	<i>Aeromonas hydrophila</i>
AM, CXM, C, E, NV, S, TE	1
AM, CXM, C, E, L, NOR, NV, S, TE	3
AM, CXM, C, E, L, NV, S, TE	5
AM, CXM, C, E, GN, L, NV, S, TE	1
Total	10

Legenda: Antibióticos testados: Ampicilina (AM), Cefuroxima (CXM), Cloranfenicol (C), Eritromicina (E), Gentamicina (GN), Lincomicina (L), Norfloxacina (NOR), Novobiocina (NV), Estreptomicina (S), Tetraciclina (TE).

TABELA 6 Índice de múltipla resistência a antibióticos apresentados por microrganismos isolados de tanques de refrigeração por expansão

Numero de microrganismos	Índice Mar
1	0,4
4	0,5
2	0,6
14	0,7
26	0,8
13	0,9

CONCLUSÕES

Os microrganismos encontrados nos tanques de refrigeração por expansão pertencentes à família enterobacteriaceae foram *Yersinia Kristensenni* (1), *Yersinia pseudotuberculosis* (1), *Klebsiella ozaenae* (14), *Stenotrophomonas maltophilia* (1), *Serratia liquefaciens* (18), *Serratia plymutica* (1) *Citrobacter freundini* (1) *Shigella flexineri* (3) e *Shigela dysinteride* (2), e os não pertencentes à família enterobacteriaceae foram *Pseudomonas fluorescens*, *Aeromonas hidrófila* e *Agrobacterium radiobacter*..

Todos os isolados apresentaram produção de proteases; a produção de lipases foi observada em *Serratia liquefaciens*, *Pseudomonas fluorescens* e *Aeromonas hidrófila*. A espécie *Pseudomonas fluorescens* foi a única a apresentar produção de lecitinases.

Todos os isolados apresentaram resistência a pelo menos 4 dos dez antibióticos testados, o que demonstra um quadro típico de multirresistência.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDOU, A. M. Purification and Partial Characterization of Psychrotrophic *Serratia marcescens* Lipase. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, n. 1, p. 127-132, Jan. 2003

AL NAIEMI, N.; HEDDEMA, E. R.; BART, A.; DE JONGE, E. C.; VANDENBROUCKE-GRAULS, M.; SVELKOU, P. H. M.; DUIM, B. Emergence of multidrug-resistant Gram-negative bacteria during selective decontamination of the digestive tract on an intensive care unit. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v. 58, n. 4, p. 853-856, Oct. 2006.

AL-SALEH, A. A.; ZAHKAN, A. S. Síntesis of extracellular lipase by a strain of *Pseudomonas fluorescens* isolated from raw camel milk. **Food Microbiology**, London, v. 16, n. 2, p. 149-156, Apr. 1999.

ALATOSSAVA, P. M.; ALATOSSAVA, T. Phenotypic characterization of raw milk-associated psychrotrophic bacteria. **Microbiological Research**, Jena, v. 12, 2006.

ALATOSSAVA P. M.; ALATOSSAVA, T. Antibiotic resistance of raw-milk-associated psychrotrophic bacteria. **Microbiological Research**, Jena, 01-015, 2006.

ALICHANIDIS, E.; ANDREWS, A. T. Some properties of the extracellular protease produced by the psychrotrophic bacterium *Pseudomonas fluorescens* strain AR-11. **Biochimica et Biophysica Acta**, Paris, v. 485, n. 2, p. 424-433, 1977.

ALONSO, A.; SANCHEZ, P.; MARTINEZ, J. L. *Stenotrophomonas maltophilia* D457R contains a cluster of genes from Gram-positive bacteria involved in antibiotic and heavy metal resistance. **Antimicrobial Agents Chemother**, Washington, v. 44, n. 7, p. 1778-1782, July 2000.

ANDRADE, N. J.; BRIDEGMAN, 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**, Des Moines, v. 61, n. 7, p. 833-838, July 1998.

ANDREWES, P.; BALDWIN, A. ; BROOME, A.; HILL, B.; HOLLAND, R.; MILLS, O.; NEWSTEAD, D. Detection of lipase in skim and whole milk powders using triheptanoin as a substrate. **International Dairy Journal**, Palmerston North, v. 17, n. 6, p. 003, June 2006

ANTHONY, E.; Van Den BOGAARD, A. E.; STOBBERINGH, E. E. Epidemiology of resistance to antibiotics links between animals and humans. **Interntional Journal Antimicrobial Agents**, Amssterdam, v. 14, n. 4, p. 327-335, May 2000.

BOGAARD, A. E.; STOBBERINGH, E. E. Epidemiology of resistance to antibiotics links between animals and humans. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 14, n. 4, p. 327-335, May 2000.

BOWER, C. K.; DAENCHEL, M. A. Resistance responses of microorganisms in food enviroments. **International Journal Food Microbiology**, Amsterdam, v. 50, n. 1/2, p. 33-44, Sept. 1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa no. 051, de 18 de setembro de 2002. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 20 set. 2002. Seção 1, p. 13-22.

BRAMLEY, A. J.; MCKINNON, C. H. The microbiology of raw milk. In: ROBINSON, R. K. **Dairy Microbiology**, London: Applie Science Publicheres, 1981. p. 119-169.

BRAUN, P.; BALZER, G.; FEHLHABER, K. Activity of bacterial lipases at chilling Temperatures. **Food Microbiology**, London, v. 18, n. 2, p. 211-215, Apr. 2000.

CAPRIOLI, A.; BUSANI, L.; MARTEL, J. L.; HELMUTH, R. Monitoring of antibiotic resistance in bactéria of animal origin: epidemiological and microbiological methodologies. **International Journal Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 14, n. 4, p. 295-301, May 2000.

COSTA, A. B.; CYRINO, J. E. P. Antibiotic resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) and *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 63, n. 3, 2006.

COUSIN, M. A. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: A review. **Journl of Food Protection**, Des Moines, v. 45, n. 2, p. 172-207, Feb. 1982

DIAS, A. F. Influência da temperatura na multiplicação de bacterias, **Jornal da Produção de Leite PDPL/RV**, Viçosa, jun. 2000.

DOGAN, B.; BOOR, K. J. Genetic Diversity and Spoilage Potentials among *Pseudomonas* spp. Isolated from Fluid Milk Products and Dairy Processing Plants. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 1, p. 130-138, Jan. 2003.

EL-SUKHON, S. N. Identification and characterization of Klebsiellae isolated from milk and milk products. **Journal Food Microbiology**, London, v. 20, n. 2, p. 225-230, Apr. 2003

ENEROTH, A.; CHRISTIANSSON, A. ; BRENDEHAUG, J. ; RAN MOLIN, G. Critical Contamination Sites in the Production Line of Pasteurised Milk, with Reference to the Psychrotrophic Spoilage Flora. **International Dairy Journal**, Oxford, v. 8, n. 9, p. 826-834, 1998.

FAGUNDES, C. M.; FISCHER, V.; SILVA, W. P. ; CARBONERA, N. ; ARAÚJO, . M. R. Presença de *Pseudomonas* spp em função de diferentes etapas da ordenha com distintos manejos higiênicos e no leite refrigerado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 2, p. 568-572, mar./abr. 2006.

FAIRBAIRN, D. J.; LAW, B. A. Proteinases of psychrotrophic bacteria: their production, properties, effects and control. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 53, n. 1, p. 139-177, Feb. 1986.

FERRARA, A. M. Potentially multidrug-resistant non-fermentative Gram-negative pathogens causing nosocomial pneumonia. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 27, n. 3, p. 183-195, Mar. 2006.

GARCÍA-ARMESTO, M. R.; SUTHERLAND, A. D. Temperature characterization of psychrotrophic and mesophilic *Bacillus* species from milk. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 64, n. 2, p. 261-270, May 1997.

GAROFALO, C.; VIGNAROLI, C.; ZANDRI, G.; AQUILANTI, L.; BORDONI, D.; OSIMANI, A.; CLEMENTI, F.; BIAVASCO, F. Direct detection of antibiotic resistance genes in specimens of chicken and pork meat. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 113, n. 1, p. 75-83, Jan. 2007.

GRIFFITHS, M. W.; PHILLIPS, J. D.; MUIR, D. D. Thermostability of proteases and lipases from a number of species of psychrotrophic bacteria of dairy origin. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 50, n. 2, p. 289-303, 1981.

GUGI, B.; ORANGE, N.; HELLIO, F.; BURINI, J. F. ; GUILLOU, C.; LERICHE, F.; GUESPIN-MICHEL, J. F. Effect of growth temperature on several exported enzyme activities in the psychrotrophic bacterium *Pseudomonas fluorescens*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 173, n. 12, p. 3814-3820, June 1991.

HIRSCH, D.; PEREIRA, D. J. P.; LOGATO, P. V. R. ; PICCOLI, R. H.; FIGUEIREDO, H. C. P. Identificação e resistência a antimicrobianos de espécies de *Aeromonas* móveis isoladas de peixes e ambientes aquáticos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 1, p. 121-1217, jan./fev. 2006.

HOLM, C.; JEPSEN, L.; LARSEN, M.; JESPERSEN, L. Predominant Microflora of Downgraded Danish Bulk Tank Milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 87, n. 5, p. 1151-1157, May 2004.

HUHN, S; HAJDENWURCEL, J. R; MORAES, J. M; VARGAS, O. L. Qualidade microbiológica do leite cru obtido por meio de ordenha manual e mecânica e ao chegar à plataforma. **Revista do Instituto de Laticíneos Candido Tostes**, Juiz de Fora, v. 35, n. 209, p. 35-38, maio/jun. 1980.

JASPE, A.; OVIEDO, P.; FERNANDEZ, L.; PALACIOS, P.; SANJOSE, C. Cooling of raw milk: change in the spoilage potential of contaminating *Pseudomonas*. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 58, n. 8, p. 915-921, Aug. 1995

JAYARAO, B. M.; WANG, L. A study on the prevalence of Gram-negative bacteria in bulk tank milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 82, n. 12, p. 2620-2624, Dec. 1999.

KO, W. C.; YU, K. W. ; LIU, C. Y. ; HUANG, C. T. ; LEU, H. S. ; CHUANG, Y. C. Increasing antibiotic resistance in clinical isolates of *Aeromonas* strains in Taiwan. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Amsterdam, v. 40, p. 1260-1262, 2003.

KOKA, R.; WEIMER, B. C. Isolation and characterization of a protease from *Pseudomonas fluorescens* RO98. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 89, n. 2, p. 280-288, Aug. 2000.

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

LECLERCQ, M. P.; GLUPCZYNSKI, M. Y.; TULKENS, P. M. Aminoglycosides: Activity and Resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Amsterdam, v. 43, n. 5, p. 727-737, May 1999.

MACRAE, A. R. **Extracellular microbial lipases**. London: Applied Science Publishers, 1983. p. 225-249.

MAMMERI, H.; VAN DE LOO, M.; POIREL, L.; MARTINEZ, L. M. ; NODMANN, P. Emergence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance in *Escherichia coli* in Europe. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 49, n. 1, p. 71-76, Jan. 2005.

MANZANO, S.; ORDÓÑEZ, J. A. ; DE LA HOZ, L.; FERNÁNDEZ, M. A rapid method for the estimation of the microbiological quality of refrigerated raw milk based on the aminopeptidase activity of Gram-negative bacteria. **International Dairy Journal**, Oxford, v. 15, n. 1, p. 79-84, Jan. 2004.

MARTINS, M. L.; PINTO, C. L. O ; ROCHA, R. B. ; ARAÚJO, E. F. ; VANETTI, M. C. D. Genetic diversity of Gram-negative, proteolytic,

psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 111, n. 2, p. 144-148, Sept. 2006.

MATEU, E.; MARTIN, M. Why is anti-microbial resistance a veterinary problem as well? **Journal of Veterinary Medicine – Serie B**, Berlin, v. 48, n. 8, p. 569-581, Oct. 2001.

MATSELIS E.; ROUSSIS, I. G. Production by *Pseudomonas fluorescens*. Proteolysis and lipolysis in thermized ewe's milk. **Food Control**, Oxford, v. 9, n. 5, p. 251-259, Oct. 1998.

MOSTELER, T. M.; BISHOP, J. R. Sanitizer efficacy against attached bacteria in milk biofilm. **Journal of Food Protection, Des Moines**, v. 56, n. 1, p. 34-41, Jan. 1993.

MUTUKUMIRA, A. N.; FERUSU, S. B.; NRAVHUS, J. A.; ABRAHAMSEN, R. K. Chemical and microbiological quality of raw milk produced by Smallholder farmers in Zimbabwe. **Journal of Food Protection, Des Moines**, v. 59, n. 9, p. 984-987, Sept. 1996.

NICODEME, M.; GRILL, J. P.; HUMBERT, G.; GAILLARD, J. L. Extracellular protease activity of different *Pseudomonas* strains: dependence of proteolytic activity on culture conditions. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 99, n. 3, p. 641-648, 2005.

NORDMANN, P.; POIREL, L. Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in Enterobacteriaceae. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v. 56, n. 3, p. 463-469, Sept. 2005.

OLIVEIRA, V. C.; ALMEIDA, J. M.; ABALEM DE SÁ, I. V.; MANDARINO, J. R.; SOLARI, C. A. Enterobactérias associadas a adultos de *Musca domestica* (Linnaeus, 1758) (Díptera: Muscidae) e *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1754) (Díptera: Calliphoridae) no jardim zoológico, Rio de Janeiro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 58, n. 4, p. 556-561, ago. 2006

ORANGE, N. Growth temperature regulates the induction of beta-lactamase in *Pseudomonas fluorescens* through modulation of the outer membrane permeation of a beta-lactam-inducing antibiotic. **Microbiology**, Reading, v. 140, n. 11, p. 3125-3130, Nov. 1994.

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**. doi:10.
1016/j. foodcont. 2006. 09. 005

PITKÄLÄ, A.; HAVERI, M.; PYÖRÄLÄ, S.; MYLLYS, V.; HONKANEN-
BUZALSKI, T. Bovine Mastitis in Finland—Prevalence, Distribution of
Bacteria, and Antimicrobial Resistance. **Journal of Dairy Science**, Champaign,
v. 87, n. 8, p. 2433-2441, Aug. 2001.

PHILLIPS, I.; CASEWELL, M.; COX, T.; DE GROOT, B.; FRIIS, C.; JONES,
R.; NIGHTINGALE, C.; PRESTON, R.; WADDELL, J. Antibiotic use in
animals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v. 53, n. 5, p. 885,
May 2004. Abstract.

RADU, S.; AHMAD, N.; LING, F. H.; REEZAL, A. Prevalence and resistance
to antibiotics for *Aeromonas* species from retail fish in Malaysia. **International
Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 81, n. 3, p. 261-266, Mar.
2003.

RAJMOHAN, S.; DODD, C. E. R.; WAITES, W. M. Enzymes from isolates of
Pseudomonas fluorescens involved in food spoilage. **Journal of Applied
Microbiology**, Oxford, v. 93, n. 2, p. 205-213, 2002.

ROWE, M. T.; DUNSTALL, G.; KILPATRICK, D.; WISDOM, G. B. Effect of
growth phase on the subsequent growth kinetics of psychrotrophic bacteria of
raw milk origin. **International Journal of Dairy Technology**, Amsterdam, v.
56 n. 1, p. 35-38, Feb. 2003.

SAHA, D.; PAL, J. In vitro antibiotic susceptibility of bacteria isolated from
EUS-affected fishes in India. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 34
n. 5, p. 311–316, 2002.

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

SALISBURY, J. G.; NICHOLLS, T. J.; LAMMERDING, A. M. J.;
TURNIDGE, M. J. A risk analysis framework for the long term management of

antibiotic resistance in food-producing animals. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, Berlin, v. 20, n. 3, p. 153-164, Sept. 2002.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. Bactérias psicotróficas e a qualidade do leite. **CBQL em Revista**, São Paulo, v. 1, p. 12-15, 2002.

SCHLEGELOVA, J.; BABAK, V.; KLIMOVA, E.; NAVRATILOVA, P.; SUSTACKOVA, A.; SEDIVA, I.; RYSANEK, D. Prevalence of and resistance to anti-microbial drugs in selected microbial species isolated from bulk milk samples. **Journal of Veterinary Medicine, Serie B**, Berlin, v. 49, n. 5, p. 216-225, June 2002.

SCHOKKER, E. P.; VAN BOEKEL, M. A. J. S. Production, purification and partial characterization of the extracellular proteinase from *Pseudomonas fluorescens* 22F. **International Dairy Journal**, Palmserston North, v. 7, p. 265-271, 1997.

SHAH, N. P. Psychrotrops in milk: a review. **Milchwissenschaft**, Munich, v. 49, n. 8, p. 432-437, 1994.

SNARY, E. L.; KELLY, L. A.; DAVISON, H. C.; TEALE, C. J.; WOOLDRIDGE, M. Antimicrobial resistance: a microbial risk assessment perspective. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v. 53, n. 6, p. 906-917, June 2004.

SORHAUG, T.; STEPANIAK, L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects. **Trends in Food Science & Technology**, Oxford, v. 8, n. 4, p. 35-41, Apr. 1997.

STOCK I.; BURAK, S.; SHERWOOD, K. J.; GRÜGER, T.; WIEDEMANN, B. Natural antimicrobial susceptibilities of strains of 'unusual' *Serratia* species: *S. ficaria*, *S. fonticola*, *S. odorifera*, *S. plymuthica* and *S. rubidaea*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v. 51, n. 4, p. 865-885, Apr. 2003.

TAKEUCHI, K.; TOMITA, H.; FUJIMOTO, S.; KUDO, M.; KUWANO, H.; IKE, Y. Drug resistance of *Enterococcus faecium* clinical isolates and the

conjugative transfer of gentamicin and erythromycin resistance traits. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 243, n. 2, p. 347–354, Feb. 2005.

TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: Resistência de estafilococos, do enterococos e do pneumococos aos antimicrobianos **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 33, n. 3, p. 281-301, 2000.

TEALE, C. J. Antimicrobial resistance and the food chain. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 92, p. 85–89, 2002. Symposium Supplement, 1.

TODHUNTER, D. A.; SMITH, K. L.; HOGAN, J. S.; SCHOENBERGER, P. S. Gram-negative bacterial infections of the mammary gland in cows. **American Journal Veterinary Research**, Schaumburg, v. 52, n. 2, p. 184-188, Feb. 1991.

TONDO, E. C.; LAKUS, F. R.; OLIVEIRA, F. A.; BRANDELLI, A. Identification of heat stable protease of *Klebsiella oxytoca* isolated from raw milk. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 38, n. 2, p. 146-150, 2003.

VALLES, B. S.; BEDRIÑANA, R. P.; TASCÓN, N. F.; SIMÓN, A. Q.; MADRERA, R. R. Yeast species associated with the spontaneous fermentation of cider. **Food Microbiology**, v. 24, p. 25-31, 2007.

VAN HOUTD, R.; MOONS, P.; JANSEN, A.; VANOIRBEEK, K.; MICHIELS, C. W. Genotypic and phenotypic characterization of a bio. Im-forming *Serratia plymuthica* isolate from a raw vegetable processing line. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 246, n. 2, p. 265–272, May 2005.

VIVEKANANDHAN, G.; SAVITHAMANI, K.; HATHA, A. A. M.; Lakshmanaperumalsamy, P. Antibiotic resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from marketed fish and prawn of South India. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 76, n. 1/2, p. 165-168, June 2002.

XAVIER, L. S. Coleta de leite em latões e a granel: Estudo de casos. **Revista do Instuto de Laticínios “Cândido Tostes”**, Juiz de Fora, v. 54, n. 314, p. 22-26, 2000.

YUCEL, N.; ERDEM, B.; KAYA, D. Some virulence properties and characterization of motile *Aeromonas* species from milk and white cheese. **International Journal of Dairy Technology**, Oxford, v. 58, n. 2, p. 106-110, May 2005.

ZAIKA, L. L.; PHILLIPS, T. J. G. Model for the combined effects of temperature, pH and sodium chloride concentration on survival of *Shigella flexneri* strain 5348 under aerobic conditions. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 101, n. 2, p. 179-187, May 2005.

ZHAO, S.; DATTA, A. R.; AYERS, S.; FRIEDMAN, S.; WALKER, R. D.; WHITE, D. G. Antimicrobial-resistant *Salmonella* serovars isolated from imported foods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 84, n. 1, p. 87-92, 2003.

ZOTTOLA, 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, Oct. 1994.

ZUREK, L.; DENNING, S. S.; SCHAL, C.; WATSON, D. W. Vector Competence of *Musca domestica* (diptera; Muscidae) for *Yersinia pseudotuberculosis*. **Entomological Society of America**, Lonham, v. 38, n. 2, p. 333-335, Mar. 2001.

WIEDMANN, M.; WEILMEIER, D.; DINEEN, S. S.; RALYEA, R.; BOOR, K. J. Molecular and Phenotypic Characterization of *Pseudomonas* spp. Isolated from Milk. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 5, p. 2085-2095, May 2000.

WITTE, W. Ecological impact of antibiotic use in animals on different complex microflora: environment. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 14, n. 4, p. 321-325, May 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. The medical impact of antimicrobial use in food animals. **Report of a WHO meeting**. Berlin, Germany, 13-17 Oct. 1997.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)