



GISELE INOCÊNCIO PEREIRA E MOREIRA

**CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS GRAM
POSITIVAS PSICROTRÓFICAS ADERIDAS EM
TANQUES DE REFRIGERAÇÃO DE LEITE
CRU QUANTO A ESPÉCIES, EXPRESSÃO DE
ENZIMAS E PERFIS DE RESISTÊNCIA A
ANTIMICROBIANOS**

LAVRAS - MG

2010

GISELE INOCÊNCIO PEREIRA E MOREIRA

**CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS GRAM POSITIVAS
PSICROTRÓFICAS ADERIDAS EM TANQUES DE REFRIGERAÇÃO
DE LEITE CRU QUANTO A ESPÉCIES, EXPRESSÃO DE ENZIMAS E
PERFIS DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Doutor.

Orientadora
Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli

LAVRAS - MG

2010

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

Moreira, Gisele Inocência Pereira e.

Caracterização de bactérias Gram positivas psicrotróficas aderidas em tanques de refrigeração de leite cru quanto a espécies, expressão de enzimas e perfis de resistência a antimicrobianos / Gisele Inocência Pereira e Moreira. - Lavras : UFLA, 2010.

104 p. :il.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2010.

Orientador: Roberta Hilsdorf Piccoli.

Bibliografia.

1. Bactérias psicrotróficas. 2. Tanques de expansão. 3. Lipases. 4. Proteases. 5. Resistência a antibióticos. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-589.95

GISELE INOCÊNCIO PEREIRA E MOREIRA

**CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS GRAM POSITIVAS
PSICROTRÓFICAS ADERIDAS EM TANQUES DE REFRIGERAÇÃO
DE LEITE CRU QUANTO A ESPÉCIES, EXPRESSÃO DE ENZIMAS E
PERFIS DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 13 de julho de 2010.

Dr. Geraldo Márcio da Costa	UFLA
Dr. Luis Roberto Batista	UFLA
Dr. Alexandre Tourino Mendonça	UNINCOR
Dr. Cleube Andrade Boari	UFVJM

Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli
Orientadora

LAVRAS - MG

2010

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, pela oportunidade de realização do Doutorado.

Aos professores do programa, pelos ensinamentos.

A minha orientadora, Profa. Roberta Hilsdorf Piccoli, pelos ensinamentos de grande valia para a minha formação. Agradeço também a atenção e a amizade oferecida.

À Fundação de Amparo a Pesquisas do Estado de Minas Gerais (Fapemig), pela concessão da bolsa de estudos.

A minha família; a minha querida mãe, Arlete; aos meus irmãos, Fábio e Deise e ao meu padrasto, Carlos, que sempre me deram apoio, incentivo e carinho. Em especial à minha mãe, por todo amor, paciência e força.

Ao meu querido pai Aldoni, “in memoriam”.

Ao meu marido, Paulo Henrique, por todo amor, paciência e apoio dispensados em diversos momentos.

Aos amigos do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e aos amigos Laboratório de Microbiologia de Alimentos, pelo companheirismo e amizade.

Aos colegas do IF Sudeste MG, campus Rio Pomba, pelo apoio oferecido neste último ano do doutorado, tornando possível a sua conclusão.

A todos os amigos que me apoiaram de diferentes formas durante esta fase da minha vida.

Por fim, agradeço a Deus por todas as oportunidades, pela felicidade de ter educação, trabalho, saúde e amor.

RESUMO

O leite pode ser contaminado por bactérias psicrotróficas em diversos pontos da cadeia produtiva, inclusive durante a estocagem refrigerada em tanques de expansão. O leite, uma vez contaminado por psicrotróficos, pode sofrer alterações no sabor, no aroma e na textura. As bactérias psicrotróficas podem apresentar resistência a diversos antibióticos. Os genes de resistência aos antibióticos podem ser transferidos para bactérias patogênicas do homem, tornando difícil o tratamento de infecções. Este trabalho foi realizado com os objetivos de identificar bactérias psicrotróficas Gram-positivas presentes em tanques de estocagem de leite cru refrigerado, avaliar a sua capacidade de produção de enzimas extracelulares (proteases, lipases e lecitinases) e verificar o seu perfil de resistência a antimicrobianos. As amostras pertenciam à coleção do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da UFLA. Essas amostras foram previamente coletadas em tanques de refrigeração por expansão para leite cru, por meio de suabes estéreis. Cinquenta e três isolados de bactérias psicrotróficas Gram-positivas foram selecionados aleatoriamente e identificados com auxílio do kit de identificação BBL *crystal Gram-positive*. Foi avaliada a produção de enzimas extracelulares utilizando ágar leite, ágar base tributirina e TSA suplementado com emulsão de gema de ovo. Para a realização do antibiograma, foram utilizados dize antibióticos para bactérias Gram-positivas. Os resultados revelaram a presença de *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Corynebacterium* spp., *Corynebacterium jeikeium*, *Corynebacterium aquaticum*, *Corynebacterium bovis*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*, *Staphylococcus* spp., *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus vitulus*, *Staphylococcus saccharolyticus*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lactococcus garviae* e *Micrococcus sedentarius* nos tanques de expansão. Os isolados produziram enzimas extracelulares; 83% dos isolados produziram proteases, 87% produziram lipases e 63% produziram lecitinase. Essas enzimas, quando presentes no leite, podem provocar a deterioração do mesmo, inclusive após o tratamento térmico do leite. Os perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos apontaram a resistência múltipla para todos os isolados testados.

Palavras-chave: Psicrotróficos. Tanques de expansão. Leite. Proteases. Lecitinases. Lipases. Resistência a antibióticos.

ABSTRACT

Milk can be contaminated by psychrotrophic bacteria in several points of the productive chain including during refrigerated storage in expansion tanks. Once contaminated by psychrotrophics milk can suffer alterations in its flavor, aroma and texture. The contaminant bacteria of milk may present resistance to several antibiotics. The genes of antibiotic resistance may be transferred via food to the pathogenic bacteria of humans rendering it difficult the treatment of infections. This work aimed to identify the Gram positive psychrotrophic bacteria present in refrigerated raw milk storage tanks, to evaluate the production capacity of extra-cellular enzymes (proteases, lipases and lecithinases) by these bacteria and to verify their antibiotic resistance profile. The samples belonged to the collection of the Laboratory of Food Microbiology of UFLA. These samples were previously collected in refrigeration expansion tanks for raw milk using sterile swab. Fifty three isolates were selected randomly and identified with the help of the identification kit BBL Crystal Gram-Positive. The production of extra-cellular enzymes using milk agar, tributyrin agar base and TSA supplemented with egg yolk emulsion was evaluated. For the antibiogram, 12 antibiotics for Gram positive bacteria were used. The results revealed the presence of *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Corynebacterium* spp., *Corynebacterium jeikeium*, *Corynebacterium aquaticum*, *Corynebacterium bovis*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*, *Staphylococcus* spp., *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus vitulus*, *Staphylococcus saccharolyticus*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* , *Lactococcus garviae* and *Micrococcus sedentarius* in the expansion tanks. The isolates were evaluated in relation to the production of extra cellular enzymes and 83% of the isolates produced proteases, 87%, lipases and 63%, lecithinases. When present in milk, these enzymes can cause its deterioration, including after it is thermally treated. Antibiotic resistance was also evaluated by means of agar diffusion test, classifying the microorganisms as resistant, intermediary and sensitive. The microorganisms were most sensitive to sulfazotrim and ciprofloxacin. All the isolates presented multiple resistance to the drugs tested.

Keywords: Psychrotrophics. Expansion tanks. Milk. Bulk milk. Proteases. Lecithinases. Lipases. Antibiotic resistance.

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 Introdução geral.....	8
1	INTRODUÇÃO	8
2	REFERENCIAL TEÓRICO	11
2.1	Qualidade microbiológica do leite.....	11
2.2	Biofilmes microbianos.....	15
2.3	Microrganismos psicrotróficos.....	17
2.4	Fisiologia de bactérias psicrotróficas.....	20
2.5	Enzimas extracelulares produzidas por psicrotróficos.....	22
2.6	Antimicrobianos: mecanismo de ação dos antibióticos e quimioterápicos.....	29
2.7	Teste de sensibilidade a antimicrobianos – método de difusão de discos.....	33
2.8	Resistência bacteriana aos antimicrobianos.....	34
3	CONSIDERAÇÕES GERAIS	40
	REFERÊNCIAS	42
	CAPÍTULO 2 Bactérias psicrotróficas Gram-positivas em tanques de refrigeração de leite cru: identificação bioquímica e produção de enzimas extracelulares.....	55
1	INTRODUÇÃO	55
2	MATERIAL E MÉTODOS	57
2.1	Isolamento e identificação bioquímica de bactérias psicrotróficas.....	57
2.1.1	Especificações do Kit BBL.....	58
2.2	Produção de enzimas extracelulares.....	61
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
3.1	Identificação dos isolados gram-positivos.....	62
3.2	Avaliação da produção de proteases, lipases e lecitinases.....	69
4	CONCLUSÃO	74
	REFERÊNCIAS	75
	CAPÍTULO 3 Perfil de resistência a antibióticos de bactérias psicrotróficas Gram-positivas presentes em tanques de refrigeração para leite.....	81
1	INTRODUÇÃO	81
2	MATERIAL E MÉTODOS	83
2.1	Avaliação da resistência a antibióticos.....	83
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	84
3.1	Perfil de resistência a antibióticos.....	84
4	CONCLUSÃO	98
	REFERÊNCIAS	99

CAPÍTULO 1

Introdução geral

1 INTRODUÇÃO

O Brasil está entre os maiores produtores mundiais de leite. Entretanto, na grande maioria, os produtores de leite são pequenos e médios. Esse quadro implica, de forma geral, em baixa tecnificação, poucos investimentos na produção e inadequado treinamento do pessoal responsável pela manipulação do leite, durante toda a cadeia de produção e armazenamento (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA, 2007).

Com a finalidade de melhorar a qualidade do leite, os laticínios implementaram programas de remuneração que incentivam e exigem do produtor primário matéria-prima de boa qualidade. Dessa forma, o produto torna-se mais competitivo no mercado, visto que os consumidores têm sido mais exigentes em relação à qualidade do leite e dos produtos lácteos oferecidos.

Além da matéria-prima, a temperatura de refrigeração, o tempo de armazenamento e a higienização adequada dos equipamentos, tanques de expansão e utensílios utilizados na indústria são fatores que influenciam a qualidade final do leite.

A conservação do leite cru sob temperaturas de refrigeração evita o crescimento de bactérias mesófilas, mas não impede o crescimento de bactérias psicrotróficas, capazes de crescer em temperaturas abaixo de 7°C. Os tanques de refrigeração devem ser mantidos limpos e sanificados, a fim de evitar a adesão, em suas paredes, de bactérias psicrotróficas.

As bactérias psicrotróficas, com exceção das termodúricas, são eliminadas com o tratamento térmico do leite. No entanto, várias de suas

enzimas proteolíticas e lipolíticas produzidas durante o período de armazenagem refrigerada do leite são termoestáveis, podendo resistir ao tratamento térmico, causando perda da qualidade dos produtos processados.

As enzimas proteolíticas bacterianas agem sobre a κ -caseína, resultando na desestabilização das micelas de caseína e na coagulação do leite. As proteases microbianas provocam geleificação do leite UHT, formação de *off-flavours* e sabor amargo no leite e em produtos lácteos.

O efeito das lipases na deterioração do alimento tem sido frequentemente descrito, visto que elas são capazes de hidrolisar gordura, até mesmo em temperaturas muito baixas (BRAUN; BALZER; FEHLHABER, 2000). A maior consequência da degradação de gordura no leite é a alteração da qualidade sensorial, devido à concentração de ácidos graxos livres produzidos, resultando em odores fortes e gosto amargo, rançoso, frutífero e azedo.

Outra característica relevante de bactérias presentes em leite, e que merece ser estudada, é a crescente resistência aos antibióticos. Agentes antimicrobianos são utilizados em rebanhos, para profilaxia e tratamento de infecções. No entanto, o uso indiscriminado tem resultado no aumento do número de populações bacterianas resistentes a agentes antimicrobianos.

A resistência a antibióticos pode ocorrer pela forma intrínseca ou natural. A resistência natural resulta de genes localizados no cromossomo, os quais codificam mecanismos que impedem o antibiótico de agir em seu sítio alvo. A resistência bacteriana adquirida pode resultar da mutação em gene cromossômico ou da aquisição de genes exógenos. Em bactérias, genes de resistência são frequentemente encontrados em plasmídeos e transposons. A transferência dos genes de resistência pode ocorrer por meio de conjugação ou por meio de bacteriófagos ou de DNA livre presente no ambiente.

Evidências microbiológicas mostram que bactérias resistentes ou determinantes de resistência podem ser passadas de animais para seres humanos

pelo contato direto e via produtos de origem animal, resultando em infecções difíceis de serem tratadas (ANTHONY; VAN DEN BOGAARD; STOBBERINGH, 2000). Nas últimas décadas, o desenvolvimento de resistência antimicrobiana tem sido pauta em discussões que levam a crer que o uso de drogas antimicrobianas e o desenvolvimento de resistência em animais e humanos são inter-relacionados. Portanto, deve haver um monitoramento do desenvolvimento de resistência em bactérias e adequações no uso de antibióticos, com a finalidade de evitar o seu uso inadequado por diversos setores da sociedade, especialmente em hospitais e fazendas.

O constante aumento de populações bacterianas resistentes a antimicrobianos e a deterioração do leite provocada por enzimas extracelulares produzidas por bactérias psicrotróficas Gram-positivas motivaram a realização deste trabalho, cujos objetivos são a identificação e a caracterização de bactérias psicrotróficas Gram-positivas presentes em tanques comunitários para refrigeração de leite cru; a avaliação de sua capacidade de produção de proteases, lipases e lecitinases e a investigação de seu perfil de resistência a antibióticos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Qualidade microbiológica do leite

O leite, por natureza, é um alimento rico em nutrientes, contendo proteínas, carboidratos, gorduras, vitaminas e sais minerais. Sua qualidade tem sido amplamente discutida no cenário nacional de produção leiteira.

Nos últimos anos, a produção nacional de leite mereceu destaque, tendo sido produzidos, no país, 27,83 milhões de litros de leite, em 2008. O Brasil ocupa a sexta posição na produção mundial de leite, atrás de EUA, Índia, China, Rússia e Alemanha (EMBRAPA, 2007). Estes números mostram a relevância da atividade leiteira para a economia brasileira.

Segundo Brito et al. (2004) e informações da EMBRAPA (2007), as características da produção leiteira no Brasil são os principais fatores que impedem um desenvolvimento mais acelerado da atividade. De forma geral, a maior parte dos produtores pode ser classificada como sendo de pequenos ou médios, com produção diária de 50 a 100 litros e de caráter familiar. Como consequência, há pouco investimento na atividade, resultando em problemas em toda a cadeia produtiva, como baixa tecnificação, falta do controle sanitário dos animais e condições higiênicas inadequadas durante a ordenha, a conservação e o transporte (SANTOS; FONSECA, 2007; VALEEVA et al., 2005).

Os microrganismos que normalmente contaminam o leite crescem numa ampla faixa de temperatura. Essa microbiota inclui microrganismos mesófilos e psicrotróficos. Os mesófilos crescem em temperatura ambiente e incluem coliformes e bactérias lácteas. Se o leite for mantido em temperatura ambiente, esses microrganismos podem atingir números elevados e provocar deterioração por acidificação. Alguns patógenos mesófilos, como *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* e isolados patogênicos de *E. coli*, também podem contaminar o leite e

causar problemas gastrintestinais. As bactérias psicrotróficas são capazes de crescer em temperaturas de refrigeração e apresentam capacidade de produzir enzimas extracelulares, como proteases e lipases termorresistentes. As bactérias termodúricas são aquelas capazes de resistir ao tratamento térmico, como, por exemplo, a pasteurização. As bactérias termodúricas não são capazes de crescer em altas temperaturas. São, na maioria, mesófilas e algumas podem ser incluídas no grupo das psicrotróficas (COUSIN, 1982; JAY, 2005; ORDONÉZ et al., 2005).

A presença de microrganismos psicrotróficos no leite depende da eficiência com que os procedimentos de limpeza e sanificação das superfícies que entram em contato com o leite são efetuados, assim como da higiene do ambiente, da temperatura de manutenção e do tempo que decorrente até o seu processamento (BANARD, 1995; COUSIN, 1982; ENEROTH et al., 2000; HOLM, 2004; MILLOGO et al., 2010; ROGICK, 1982). A contaminação do leite por microrganismos psicrotróficos compromete a estabilidade do leite e de seus produtos, pois promove a deterioração de proteínas, gorduras e açúcares (CHAMBERS, 2002; COUSIN, 1982; ELMOSLEMANY et al., 2010).

Os sítios onde os microrganismos psicrotróficos são mais comumente encontrados são as superfícies dos tetos mal lavados, o úbere acometido por infecções e os equipamentos de ordenha mal higienizados. A contaminação do leite pode ocorrer por meio das tubulações de transporte do leite ordenhado, pela superfície dos tanques de refrigeração e pela água utilizada na higienização dos equipamentos de ordenha (BANARD, 1995; COUSIN, 1982; ENEROTH et al., 2000; PORETT, 1990).

A contagem bacteriana total do leite pode aumentar significativamente quando em contato com equipamentos em que a limpeza e a sanitização são deficientes, pois os microrganismos proliferam nos resíduos de leite presentes em recipientes, borrachas, junções e qualquer outro local onde possa ocorrer

acúmulo de resíduos (GUERREIRO et al., 2005; MILLOGO et al., 2010; RAJMONHAN, 2002).

É fundamental que a água utilizada para fins de limpeza seja potável, com baixa contaminação por coliformes e outros gêneros bacterianos, como *Pseudomonas* e *Bacillus* (COUSIN; BRAMLEY, 1981; ENEROTH et al., 2000).

Considerando os problemas relacionados à produção leiteira brasileira, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) iniciou, na década de 1990, discussões em busca de soluções e alternativas para melhorar a qualidade do leite e de seus derivados. Finalmente, em 2002, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento publicou a Instrução Normativa 51 (IN51), que regulamenta a produção, a identidade e a qualidade do leite tipo A, B, C, do leite pasteurizado e do leite cru refrigerado. Regulamenta também a coleta do leite cru refrigerado e seu transporte a granel (BRASIL, 2002; NERO; VIÇOSA; PEREIRA, 2009).

Uma das principais alterações preconizadas pela IN51 diz respeito ao leite tipo C. Até então, não havia parâmetros microbiológicos específicos para o leite cru destinado ao beneficiamento desse tipo de leite pasteurizado. De acordo com as novas normas, esse leite deve ser refrigerado já na propriedade e apresentar contagem de aeróbios mesófilos máxima de 10^5 UFC/mL, objetivo a ser atingido em diferentes prazos, de acordo com a localização geográfica da região produtora (BRASIL, 2002; NERO et al., 2005).

Outro importante objetivo da IN51 a ser alcançado é a redução da contagem de células somáticas (CCS), em prazos similares aos estabelecidos para contagem de aeróbios mesófilos (Tabela 1). Todas essas normas buscam a melhoria da qualidade do leite cru produzido no Brasil (NERO et al., 2005).

A IN 51 admite o uso coletivo de tanques de refrigeração a granel por produtores de leite. A localização do equipamento deve ser estratégica,

facilitando a entrega do leite de cada ordenha no local em que o mesmo estiver instalado. Também não é permitido acumular a produção de mais de uma ordenha em determinada propriedade rural, com a finalidade de enviá-la uma única vez ao dia aos tanques de refrigeração comunitários. Os tanques também devem ser adequadamente higienizados, logo após a entrega do leite, utilizando enxágue com água corrente, detergente biodegradável e escovas apropriadas (BRASIL, 2002).

As principais vantagens da refrigeração são a diminuição dos custos de transporte e a uniformização do suprimento, além da redução da acidificação precoce do leite cru, por inviabilizar o desenvolvimento de microrganismos mesófilos (BOOR et al., 1998; PRATA, 2001).

Embora promova queda na taxa de multiplicação bacteriana, a redução da temperatura de estocagem e de transporte do leite é seletiva para as bactérias psicrófilas que, em períodos prolongados em temperaturas iguais ou menores a 7°C, passam de minoria a dominantes, apresentando considerável potencial deteriorativo (COUSIN, 1982; NERO et al., 2005; NÖRNBERG et al. 2010; SILVEIRA; CARVALHO; TEIXEIRA, 1998).

Segundo a Instrução Normativa 51 (BRASIL, 2002), a temperatura de refrigeração do leite deve ser igual ou inferior a 4°C, em se tratando de tanques de refrigeração por expansão direta, ou temperatura igual ou inferior a 7°C, nos casos dos tanques de refrigeração por imersão, em tempo máximo de três horas após o término da ordenha, independente de sua capacidade (BRASIL, 2002).

Para a manutenção da temperatura ideal nos tanques refrigeradores, é necessário que estes estejam em perfeito funcionamento. Infelizmente o fornecimento de energia elétrica no campo, muitas vezes, deixa a desejar, prejudicando a refrigeração e acarretando mais problemas em relação à qualidade final do leite (AMARO, 2002).

Pinto, Cardoso e Vanetti (2004) avaliaram o cumprimento dos itens da IN51 em propriedades nas quais havia tanques de refrigeração por expansão direta no município de Viçosa, MG. Os autores constaram que: em 85,7% dos locais onde os tanques estavam instalados, as janelas não apresentavam telas de proteção; em 57% das propriedades o tempo entre a ordenha e a chegada do leite para refrigeração era superior ao limite máximo permitido, que é de 60 minutos e os procedimentos de higienização dos latões não atendiam às recomendações da IN51 e em 42,9% dos casos, a higiene pessoal dos funcionários encarregados pelo recebimento do leite estava em desacordo.

O não cumprimento das ações descritas pela IN51, associado a procedimentos inadequados de higienização, pode resultar na perda da qualidade do leite, além de propiciar ambientes para a adesão de bactérias e, até mesmo, formação de biofilmes microbianos nos equipamentos e tanques de resfriamento de leite.

2.2 Biofilmes microbianos

Biofilmes são definidos como ecossistemas biológicos embebidos em uma matriz constituída de substâncias poliméricas extracelulares, aderidos a uma superfície (SHARMA; ANAND, 2002).

Os biofilmes contêm partículas de proteínas, lipídeos, fosfolipídeos, carboidratos, sais minerais e vitaminas que formam uma camada debaixo da qual os microrganismos continuam a crescer. O biofilme pode ser formado por apenas uma espécie ou por multiespécies; neste último caso, é o mais comumente encontrado no ambiente e em superfícies, inclusive as utilizadas em indústrias alimentícias (O'TOOLE; KAPLAN; KOLTER, 2000).

As bactérias formadoras de biofilme podem viver de forma livre (planctônicas) ou em comunidades aderidas a um substrato (bactérias sésseis).

As células bacterianas podem formar biofilme em superfície de aço inoxidável, vidro, alumínio, teflon, materiais de náilon e borracha encontrados em ambientes utilizados para processar alimentos (SHIRTILIFF et al., 2002).

O biofilme é formado após algumas etapas que incluem pré-adesão, adesão reversível e adesão irreversível. Inicialmente, os microrganismos planctônicos recebem algum estímulo (que incluem disponibilidade de nutrientes, temperatura e pH) que os leva a aderir à superfície (Oulahal et al., 2008). Durante a adesão reversível ocorre a interação célula-superfície, acarretando em colonização inicial. Após 15 minutos de contato da bactéria com a superfície, os genes que regulam a produção de exopolissacarídeos (EPS) são ativados. As células aderidas podem retornar ao seu estado planctônico; logo, a adesão é reversível (OULAHAL et al., 2008; SAUER et al., 2002).

A adesão irreversível é caracterizada pela presença de microcolônias e aumento na produção de EPS. Os genes envolvidos na comunicação entre as células (sistema *quorum sensing*) também são ativados (OULAHAL et al., 2008). O *quorum sensing* favorece o acesso a nutrientes e aumenta a capacidade de diferenciação das bactérias em formas mais adaptadas à sobrevivência em ambientes mais hostis. Esse sistema regula uma série de características fenotípicas, incluindo produção de antibióticos, diferenciação celular, transferência de plasmídeos, produção de enzimas hidrolíticas extracelulares, esporulação, motilidade e produção de toxinas e de fatores de virulência (SMITH; FRATAMICO; NOVAK, 2004). A população do biofilme aumenta assim como a produção e a deposição de EPS, aumentando a espessura do biofilme (CHENG, 2007). A maturação resulta na geração de uma arquitetura complexa, com canais e poros permitindo a transferência de água e nutrientes. Posteriormente, a maturidade do biofilme pode ocorrer o destacamento das células que, por sua vez, podem contaminar linhas de processamento em laticínios (CHENG et al., 2007).

No biofilme, os microrganismos estão mais resistentes à ação de agentes químicos e físicos, como os utilizados nos procedimentos de higienização. O exopolissacarídeo age como uma barreira física, impedindo o contato dos agentes sanificantes com as células bacterianas (DRENKARD, 2003).

As falhas nos procedimentos de higienização permitem que os resíduos aderidos aos equipamentos e utensílios transformem-se em potencial fonte de contaminação. A ocorrência de biofilmes em tanques de refrigeração, tubulações e equipamentos nas indústrias de laticínios representa risco antes e após o processamento do leite, podendo causar deterioração e enfermidades de origem alimentar (AKUTSU, 2001).

2.3 Microrganismos psicrotróficos

De acordo com as normas da *International Dairy Federation* e segundo alguns autores (COLLINS, 1981; CROMIE, 1992; COUSIN, 1982; FRANK; CHRISTEN; BULLERMAN, 1992), os psicrotróficos são definidos como microrganismos que podem crescer a 7°C ou menos, independente da temperatura ótima de crescimento (25°-30°C). Resumidamente, pode-se dizer que bactérias psicrotróficas são capazes de crescer em temperatura de refrigeração, porém, apresentam crescimento ótimo em temperatura ambiente (ROWE et al., 2003).

Microrganismos psicrotróficos encontram-se amplamente distribuídos na natureza, podendo estar presentes nos mais diversos ambientes, independente do clima ou da estação do ano (COUSIN, 1982). Muitos são provenientes de água, solo e vegetação, podendo ser encontrados também em ar e poeira. Os microrganismos psicrotróficos já foram encontrados em grama, esterco, águas paradas e correntes, plantas, animais e, até mesmo, no leite (COUSIN, 1982; SANTOS; FONSECA, 2002).

Diversos gêneros de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas capazes de crescerem sob temperaturas de refrigeração podem ser encontradas no leite. As bactérias psicrotróficas Gram-negativas incluem os gêneros *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas* e *Achromobacter* (COUSIN, 1982; HAYLES; BOOR, 2001; MARTINS, 2006; SORHAUG; STEPANIAK, 1997; STEPANIAK, 2000), *Serratia* (MARTINS, 2006; SORHAUG; STEPANIAK, 1997) e *Yersinia* (MARTINS, 2006). As bactérias Gram-positivas isoladas de leite capazes de crescer em temperaturas de refrigeração pertencem aos gêneros *Bacillus*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium* e *Lactobacillus* (COUSIN, 1982; ERCOLINE et al., 2008; FRANK; CHRISTEN; BULLERMAN, 1992; HAYLES; BOOR, 2001; SORHAUG; STEPANIAK, 1997). Além destes, Chye, Abdullah e Ayob (2004) incluíram também a *Listeria monocytogenes*.

Os mesmos gêneros de bactérias psicrotróficas Gram-positivas encontradas em leite também podem ser encontrados nos tanques de expansão para refrigeração de leite cru.

Holm et al. (2004) analisaram amostras de tanques de refrigeração por expansão e encontraram bactérias psicrotróficas Gram-negativas e Gram-positivas. Entre as Gram-positivas encontradas estavam bactérias corineformes, *Lactococcus* spp., *Micrococcus* spp. e *Staphylococcus* spp. Esses microrganismos foram encontrados em 53% das amostras. *Bacillus* spp., *Enterococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* e leveduras também foram encontrados, porém, em menor número, em 25% das amostras.

Silva (2006) analisou a microbiota presente em tanques de expansão para refrigeração de leite cru. Silva (2006) encontrou nos tanques *Enterobacter* spp., *Enterobacter hafnia*, *Pseudomonas* spp., *Streptococcus* spp., *Micrococcus* spp., *Staphylococcus* spp. e *Bacillus* spp.

Pseudomonas spp. e *Bacillus* spp. são os principais gêneros envolvidos na alteração do leite (MARSHALL; SCHIMIDT, 1988; SORHAUG; STEPANIAK, 1997). Estas bactérias, *Pseudomonas* (Gram-negativo) e *Bacillus* (Gram-positivo), predominam e podem provocar alterações no leite por meio de secreção de enzimas extracelulares. No gênero *Pseudomonas*, destaca-se a espécie *Pseudomonas fluorescens*, frequentemente isolada no leite cru refrigerado, em tanques de expansão. Dentre as bactérias do gênero *Bacillus*, destaca-se *Bacillus cereus* por ser considerada patogênica. Os microrganismos do gênero *Bacillus* são formadores de esporos termorresistentes (COUSIN, 1982; DESMASURES; GUEGUEN, 1997; PRATA, 2001).

Ambos, *Pseudomonas* spp. e *Bacillus* spp., são considerados microrganismos proteolíticos e lipolíticos capazes de promover alterações indesejáveis no leite e produtos lácteos. Os microrganismos do gênero *Bacillus* ainda desempenham outro papel característico na deterioração do leite. Seus principais alvos são o leite e seus derivados submetidos ao tratamento térmico, uma vez que, resistindo à pasteurização, sofrem uma seleção favorável, sem encontrar competidores (COUSIN, 1982; DESMASURES; GUEGUEN, 1997; PRATA, 2001). Sua presença vem se tornando cada vez mais importante na conservação do leite, devido ao potencial de determinadas espécies em formar esporos e sobreviver aos tratamentos térmicos comumente utilizados (COUSIN, 1982; PRATA, 2001).

A quantidade de bactérias psicrotróficas necessárias em um determinado produto para que possa haver alterações e causar problemas está em torno de 10^6 UFC/mL (CROMIE, 1992; PINTO; MARTINS; VANETTI, 2006; SORHAUG; STEPANIAK, 1997).

Valeriano (2007) trabalhou com bactérias psicrotróficas Gram-negativas isoladas de tanques de expansão para refrigeração de leite cru. De acordo com a autora, as contagens de psicrotróficos nos tanques variaram entre $3,0 \times 10^2$ e $1,9$

x 10^7 UFC/cm². Este resultado pode causar alterações no leite e sugere práticas higiênicas inadequadas, incapazes de garantir baixa contaminação do leite armazenado sob refrigeração.

Contagens altas de bactérias psicotróficas podem causar grandes prejuízos econômicos, devido às suas características deteriorativas (CARVALHO, 2001; COUSIN, 1982; FRANK; CHRISTEN; BULLERMAN, 1992; MANZANO et al., 2004; TONDO et al., 2003).

2.4 Fisiologia de bactérias psicotróficas

A maioria das bactérias psicotróficas, quando crescem em temperaturas mais baixas, sintetizam lipídeos neutros e fosfolipídeos contendo um aumento na proporção de ácidos graxos insaturados (KUMAR; JAGANNADHAM; RAY, 2002; JAY, 2005; RUSSEL; NICHOLS, 1999). As mudanças induzidas por baixas temperaturas na composição dos ácidos graxos sugere que eles estão associados aos mecanismos fisiológicos da célula. O aumento no grau de insaturação de ácidos graxos em lipídeos provoca um decréscimo no ponto de fusão de lipídeos. Essa alteração tem a função de manter o estado fluido dos lipídeos, permitindo a permeabilidade e a atividade da membrana plasmática, facilitando o transporte sob baixas temperaturas (KUMAR; JAGANNADHAM; RAY, 2002; JAY, 2005; RUSSEL; NICHOLS, 1999).

Apesar das alterações no padrão dos lipídeos, há relatos que, em psicotróficos Gram-negativos, pode ocorrer um decréscimo da permeabilidade da membrana externa sob baixas temperaturas. A maior proteína de membrana (OprF) está envolvida neste fenômeno. Experimentos *in vitro* com essa porina revelaram que o tamanho do canal dessa proteína pode ser menor sob baixas temperaturas. Em observações realizadas com bactérias que cresceram em temperaturas menores que 8°C constatou-se que o canal dessa porina apresentou

um terço do tamanho quando comparado ao de bactérias que cresceram sob temperatura ótima (28°C). Esse fato sugere que o tamanho do poro OprF é dependente da temperatura. Resultados similares foram obtidos investigando psicrotróficos como *Pseudomonas fluorescens* linhagem OE 28.3 (JAOUEN et al., 2004). A diminuição dos poros devido às baixas temperaturas pode restringir a passagem de proteínas maiores para o interstício intracelular. Com a finalidade de compensar essa perda, os psicrotróficos sintetizam maiores quantidades de enzimas extracelulares. Essas enzimas atuam hidrolizando proteínas e lipídeos, fornecendo peptídeos de baixo peso molecular e ácido graxo aos psicrotróficos que crescem em baixas temperaturas.

Os psicrotróficos têm taxas metabólicas mais lentas sob baixas temperaturas, no entanto, não cessam seu crescimento. Apesar da diminuição da atividade metabólica, os psicrotróficos apresentam boa atividade enzimática (KUMAR; JAGANNADHAM; RAY, 2002; RUSSEL; NICHOLS, 1999).

A expressão de algumas proteínas específicas para proteção ao frio é detectada em microrganismos psicrotróficos. A proteína CS 7.4 é produzida para combater o choque frio e totaliza cerca de 13% de toda proteína celular (BERGER et al., 1996).

Bactérias psicrotróficas também podem sintetizar proteínas aclimatadoras do frio (Caps), durante o crescimento em baixas temperaturas. Essas proteínas nunca foram descritas em mesófilos. Ainda não há informações sobre sua estrutura e função específica. Sabe-se que essas proteínas estão envolvidas na aclimação ao frio e elas parecem estar envolvidas na manutenção das funções metabólicas em baixas temperaturas, por substituírem peptídeos desnaturados pelo frio. Algumas das Caps poderiam atuar como proteases específicas que eliminam proteínas desnaturadas pelo frio que acumulam e poderiam ser deletérias para a própria célula. Outras poderiam estar envolvidas na manutenção da fluidez da membrana celular sob baixas

temperaturas (BERGER et al., 1996). Essas alterações são essenciais para a manutenção do crescimento de bactérias psicrotróficas em temperaturas de refrigeração.

2.5 Enzimas extracelulares produzidas por psicrotróficos

A pasteurização e outros tratamentos subsequentes destroem ou removem os microrganismos presentes no leite, mas proteases e lipases extracelulares termorresistentes produzidas por eles representam um importante fator de deterioração do leite durante a estocagem (MANZANO et al., 2004; NÖRNBERG et al., 2010; SORHAUG; STEPANIAK, 1997; TONDO et al. 2003).

O leite submetido ao tratamento UHT tem sido alvo de discussões devido ao aparecimento de defeitos como sedimentação, coagulação parcial ou total, mesmo em produtos dentro do prazo de validade (PRATA, 2001).

A contagem de microrganismos psicrotróficos e a contagem de células somáticas no leite cru são fatores determinantes para o aumento da geleificação no leite UAT. O desenvolvimento de *off-flavors* e problemas na textura de queijos fabricados com leite contaminado por psicrotróficos é causado por proteases sintetizadas por estas bactérias, que atingem contagens entre 2×10^6 - 5×10^8 UFC/mL (NÖRNBERG et al., 2010; SORHAUG; STEPANIAK, 1997).

Segundo Sorhaug e Stepaniak (1997), a principal alteração na vida de prateleira do leite UAT deve-se à ação de enzimas proteolíticas e lipolíticas nativas do leite ou de origem microbiana.

As enzimas naturais são provenientes da corrente sanguínea do animal, excretadas junto com o leite. A principal protease natural do leite é a plasmina, que se associa à micela de caseína. As proteínas lácteas hidrolisadas pela plasmina são as caseínas β e α_2 . A plasmina tem certa resistência térmica à

pasteurização (CHEN; COOLBEAR; DANIEL, 2003; FANG; SANDHOLM, 1995; KELLY; FOX, 2006).

As proteases microbianas também hidrolisam a caseína, porém, com preferência para a κ -caseína. As proteases microbianas, em grande parte, são termoestáveis, permanecendo ativas mesmo após os processos usuais de pasteurização (NÖRNBERG et al., 2010).

Com base nas afirmações de diversos autores (BOOR et al., 1998; CARVALHO, 2001; FAIRBAIRN; LAW, 1986; MOTTAR, 1981; NÖRNBERG et al., 2010; ROWE, 2003; SORHAUG; STEPANIAK, 1997; STEAD, 1987; TONDO et al., 2003), pode-se dizer que tratamentos térmicos convencionais são incapazes de inibir a ação dos microrganismos psicrotróficos, capazes de produzir enzimas proteolíticas e lipolíticas com impressionante resistência a tratamentos térmicos, como a pasteurização e o tratamento UAT (SORHAUG; STEPANIAK, 1997; STEAD, 1987).

A estabilidade térmica das proteases se deve à presença de zinco no sítio ativo, à ligação com o cálcio que, por sua vez, proporciona maior estabilidade à enzima, aos grupos sulfidrila, ao alto conteúdo de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos e às várias pontes de hidrogênio (CHEN; COOLBEAR; DANIEL, 2003; FAIRBAIRN; LAW, 1986; SORHAUG; STEPANIAK, 1997).

As enzimas proteolíticas podem ser classificadas como exopeptidases e endopeptidases. As exopeptidases atuam na extremidade carboxil ou amino da cadeia polipeptídica e as endopeptidases atuam no interior da cadeia polipeptídica. Em função dos resíduos de aminoácidos presentes no sítio catalítico, responsáveis pela catálise, as peptidases também podem ser denominadas como cisteíno (papaína, catepsina B), serino (tripsina, quimotripsina, plasmina, subtilisina), aspártico (pepsina, catepsina D) e metalo-endopeptidases (termolisina) (DIAS, 2007; WHITTAKER, 2003).

As proteases microbianas mais estudadas são proteases sintetizadas por espécies de *Pseudomonas*. Sua principal protease extracelular é uma metaloprotease, que apresenta pH ótimo entre 6,5 a 8. As metaloproteases são tipicamente mais resistentes ao calor (CHEN; COOLBEAR; DANIEL, 2003; FAIRBAIRN; LAW, 1986).

Os *Bacillus* também têm sido estudados devido a seu potencial proteolítico. A enzima mais conhecida sintetizada por espécies de *Bacillus* é a subtilisina, classificada como serinoprotease (CARREIRA et al., 2004). O mecanismo de ação da serinoprotease está representado na figura 1.

A subtilisina é sintetizada por *B. licheniformis* e *B. subtilis*. Esta enzima é utilizada para a produção de hidrolisados proteicos, na indústria de cervejaria e na fabricação de queijos (CARREIRA et al., 2004).

As espécies de *Bacillus* geralmente sintetizam uma variedade de proteases e lipases. De acordo com Chen, Coolbear e Daniel (2004), as serinoproteases e as metaloproteases são as mais comuns (CHEN; COOLBEAR; DANIEL, 2004) e 50% das proteases sintetizadas por linhagens de *Bacillus* mantiveram-se ativas mesmo após a pasteurização.

A grande maioria das proteases sintetizadas por bactérias psicrotróficas pertence às classes das serinoproteases e metaloproteases (CHEN; COOLBEAR; DANIEL, 2003; NÖRNBERG et al., 2010).

Os microrganismos psicrotróficos produzem proteases que atuam primariamente durante a estocagem do leite sob refrigeração, antes do tratamento térmico. A maior parte das proteases de psicrotróficos apresenta atividade estritamente relacionada ao leite (SORHAUG; STEPANIAK, 1997).

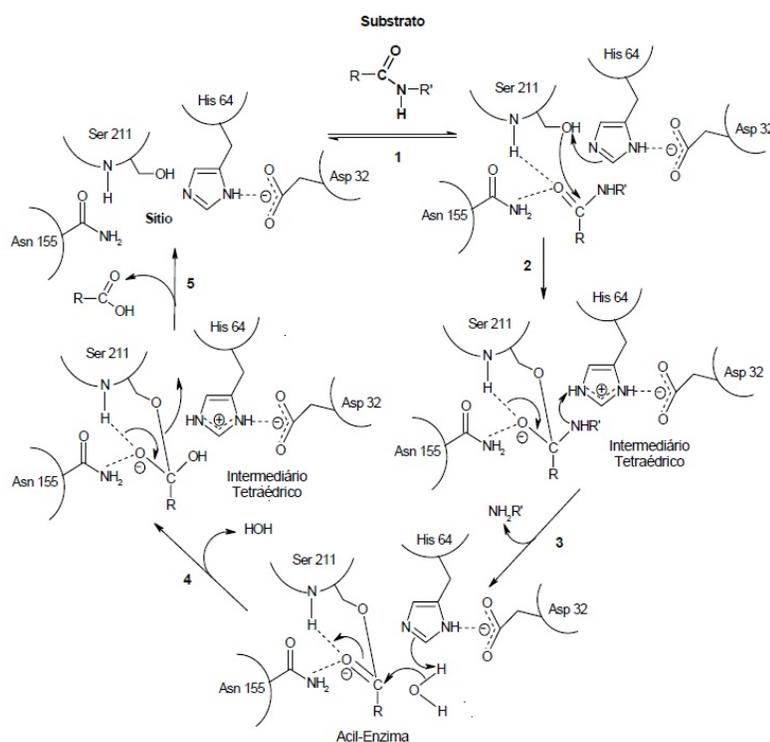


Figura 1 Esquema do mecanismo de ação catalítico das serino-endopeptidases (subtilisina). 1: ligação reversível e formação do [E-S]; 2. Ataque nucleofílico do ânion $-O-$ da Ser 211 ao C carbonílico da ligação peptídica a ser clivada, levando à formação de um intermediário tetraédrico. Este passo é favorecido pela catálise básica da His 64; 3. Colapso do intermediário em acilenzima, via protonação do C da ligação a ser clivada por ação do grupo imidazol da His 64, com liberação do segmento polipeptídico aminado do substrato; 4. ataque nucleofílico da água, intermediado pela His 64, formando um novo intermediário; 5. quebra deste intermediário via protonação do O- da Ser 211 por ação da His 64, liberando o segmento polipeptídico carboxilado do substrato (BELITZ; GROSCH; SCHIEBERLE, 2004; PRICE; STEVENS, 1993; WONG, 1995 apud DIAS, 2007)

As proteases hidrolisam as caseínas, que são as maiores proteínas do leite, sendo a α -lactoalbuminas e as β -globulinas consideradas proteínas menores pertencentes à fase de soro do leite (KOHLMANN et al., 1991; TONDO et al.,

2003). Cerca de 80% das proteínas do leite são caseínas, organizadas na forma de micelas contendo 92% de proteínas e 8% de sais inorgânicos, especialmente o fosfato de cálcio (ROLLEMA, 1992).

As caseínas são divididas em subclasses, α -caseína, β -caseína, κ -caseína, sendo que todas as caseínas do leite estão contidas nas micelas (KOHLMANN et al., 1991; TONDO et al., 2003). Segundo o modelo de Walstra (1990), as micelas são formadas por submicelas, esféricas, agregando as moléculas de caseína (α_1 , α_2 , β , κ e γ) mantidas unidas por interações hidrofóbicas e pontes salinas. Além disso, citrato, cálcio e, principalmente, fosfato coloidal de cálcio são componentes que integram e estabilizam a micela (MORENO et al., 2000; TONDO et al., 2003).

Os efeitos das proteases naturais ou bacterianas, no leite e em produtos lácteos, se dão nas subunidades de caseína. As proteases bacterianas hidrolisam especialmente a κ e β -caseína, sendo a κ -caseína hidrolisada por estar mais exposta à protease, devido ao seu posicionamento na periferia da micela (SANTOS; CARVALHO; ABREU (1999).

A hidrólise provocada na κ -caseína por meio da ação de proteases bacterianas é semelhante à hidrólise provocada pela quimiosina. A hidrólise pode ocorrer em pontos próximos ou na mesma posição em que ocorre a hidrólise pela quimiosina. A hidrólise da κ -caseína por enzimas, como a quimiosina, ocorre com a clivagem nas posições 105-106 (Phe-Met) na porção C-terminal da κ -caseína (LOURENÇO, 2000; ROMAN, 2002). A κ -caseína localiza-se na superfície das micelas, estabilizando a partícula, sua hidrólise desestabiliza a molécula causando coagulação do leite (DATA; DEETH, 2001; GINGER; GRIGOR, 1999; LOURENÇO, 2000; ROMAN, 2002). A geleificação, que ocorre em produtos lácteos durante sua vida de prateleira, pode ser resultado da degradação proteolítica da caseína, que torna as micelas

sensíveis à agregação (MOTTAR, 1981; SORHAUG; STEPANIAK, 1997; TONDO et al., 2003).

O desenvolvimento de adstringência em amostras de leite cru e em amostras de leite pasteurizado ou tratado com temperatura ultra-alta (UAT) tem sido associado à produção de polipeptídios formados em virtude da ação das proteases.

A ação das proteases também resulta na perda de rendimento de queijos, formação de *off-flavours* e coagulação das proteínas do leite (UHT) durante o armazenamento (NÖRNBERG et al., 2010; SORHAUG; STEPANIAK, 1997; TONDO et al., 2003).

As proteases não são as únicas enzimas a causar perdas na qualidade do leite. As lipases são capazes de hidrolisar os glóbulos de gordura, até mesmo em temperaturas baixas, utilizadas para refrigeração do leite (HASAN; SHAH; HAMEED, 2009).

Em geral, as lipases bacterianas apresentam massa molecular em torno de 30 a 50 kDa e pH ótimo entre 7 e 9. A maioria delas é específica para as posições sn-1 e sn-3 dos triacilgliceróis e hidrolisa diacilgliceróis e monoacilgliceróis mais rápido que os trigliceróis (MACRAE, 1983).

As enzimas lipolíticas podem ser definidas como carboxil-esterases que hidrolisam acilgliceróis. As enzimas lipolíticas bacterianas são divididas em dois grupos como mostrado na Figura 2 (JAEGER et al., 1994).

O primeiro grupo não é específico: as enzimas lipolíticas liberam ácidos graxos livres de todas as três posições do acilglicerol, hidrolisando os triacilgliceróis a ácido graxo e glicerol. O segundo grupo é específico, liberando ácidos graxos com a hidrólise nas posições 1 e 3 dos triacilgliceróis, levando à formação de 1,2 diacilglicerol, 2,3 diacilglicerol, 2-monoacilglicerol e ácidos graxos livres (JAEGER et al., 1994; MACRAE, 1983).

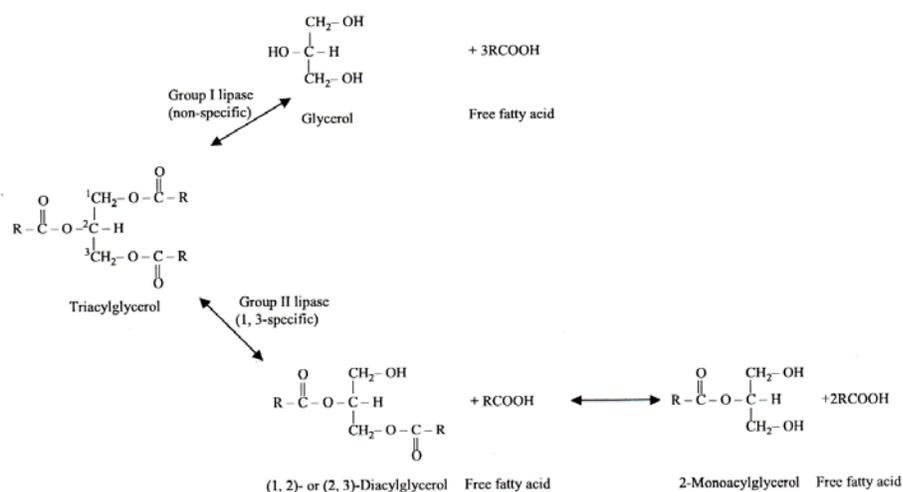


Figura 2 Hidrólise específica e não específica de triglicerídeos do leite por meio da ação de lipases (JAEGER et al., 1994)

A formação de di e monoglicerídeos, com posterior produção de ácidos graxos livres, altera o sabor. Este processo provoca rancidez, tornando o alimento impróprio para o consumo (ANDREWES et al., 2006; HASAN; SHAH; HAMEED, 2009). Geralmente, sabores rançosos e de sabão são resultado da hidrólise dos triglicerídeos da gordura do leite em diversos ácidos graxos de cadeia curta e de cadeia média, como o butírico (C_4), o caprílico (C_8), o cáprico (C_{10}) e o láurico (C_{12}) (CHEN; COOLBEAR; DANIEL, 2003; LAW, 1979; SILVEIRA; CARVALHO; TEIXEIRA, 1998).

Alguns autores destacam o aparecimento de importantes alterações decorrentes da ação lipolítica, como fortes sabores e odores amargos, frutíferos e azedos que podem se desenvolver no leite quando o ácido butírico e outros ácidos graxos livres são degradados (COUSIN, 1982; CHEN; COOLBEAR; DANIEL, 2003; LAW, 1979). Estes ácidos graxos livres tornam-se precursores para a formação de outros compostos, tais como acetoácidos, cetonas e ésteres, que podem contribuir para a formação de sabores e odores indesejáveis (VULFSON, 1994; CHEN; COOLBEAR; DANIEL, 2003).

A estocagem de leite cru por prolongados períodos antes do processamento aumenta a probabilidade do crescimento de bactérias psicrotróficas, caso estejam presentes no leite, com produção de enzimas termorresistentes capazes de causar deterioração e consequentes perdas de produtos lácteos (LAW; ANDREWS; SHARPE, 1977; MANZANO et al., 2004; SORHAUG; STEPANIAK, 1997).

2.6 Antimicrobianos: mecanismo de ação dos antibióticos e quimioterápicos

Os antibióticos são conhecidos pelo seu efeito bactericida (provocando a morte do microrganismo) e bacteriostático (inibe seu crescimento), desde que o microrganismo seja sensível a ele (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

O mecanismo de ação dos antibióticos é exercido por meio da interferência na síntese da parede celular, na alteração da permeabilidade da membrana plasmática, na replicação do cromossomo e na síntese proteica (Figura 03). Outros antimicrobianos, como sulfas e trimetoprim, agem no metabolismo celular, impedindo a biossíntese de ácido tetraidrofólico, necessário para a síntese de ácidos nucleicos (JACOBY; ARCHER, 1991; (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005); WILHELM; ESTES, 1999; WRIGHT, 1999).

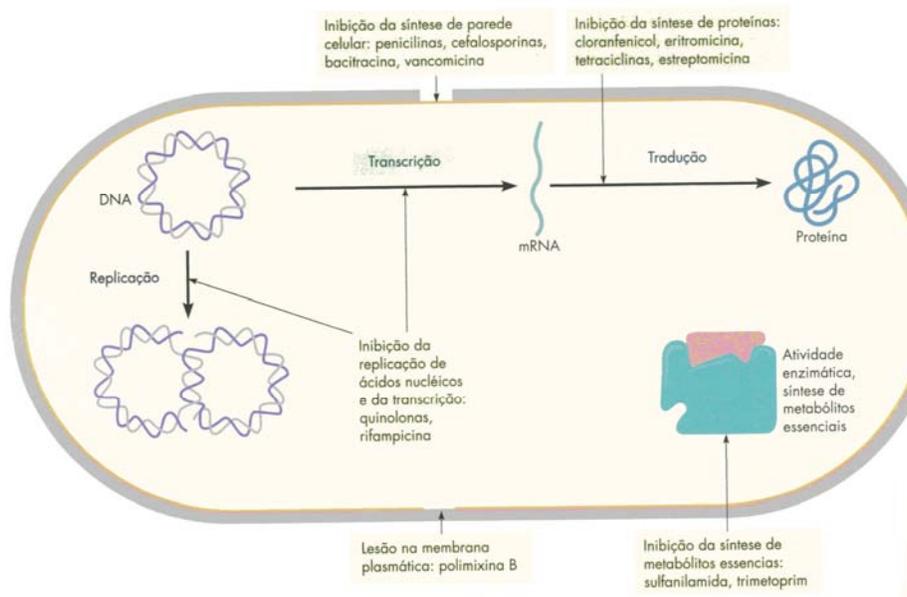


Figura 3 Mecanismos de ação dos antibióticos na célula bacteriana (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005)

Há disponíveis no mercado várias classes de antimicrobianos utilizados no combate as bactérias. Alguns são mais eficientes quando empregados contra bactérias Gram-negativas e outros, como as penicilinas, são mais eficientes em bactérias Gram-positivas (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

A síntese da parede celular bacteriana pode ser inibida por vários antibióticos, como penicilinas naturais, penicilinas semissintéticas como a oxacilina, cefalosporinas e vancomicina. Todas as penicilinas possuem, em comum, uma estrutura central contendo um anel β -lactâmico denominado núcleo. Os antibióticos β -lactâmicos são descritos como inibidores do alongamento da cadeia do peptidoglicano, interferindo na atividade de várias enzimas que participam de sua síntese final. A interferência com a função das transpeptidases é bem conhecida. Essas enzimas atuam no final da síntese do peptidoglicano, promovendo a formação de ligações cruzadas que dão rigidez

ao mesmo. A interferência na função das transpeptidases impede a correta formação da parede celular (JACOBY; ARCHER, 1991; TORTORA; FUNKE; CASE, 2005; WILHELM; ESTES, 1999; WRIGHT, 1999). As cefalosporinas inibem a síntese da parede celular da mesma forma que as penicilinas, entretanto, as cefalosporinas diferem das penicilinas porque são resistentes às penicilinases e têm maior espectro de ação. A vancomicina faz parte de um pequeno grupo de antibióticos glicopeptídicos e que também interferem na síntese da parede celular. Este antibiótico forma um complexo d-alanil-D-alanina com precursores do peptidoglicano, impedindo a realização das ligações cruzadas (BERGER-BÄCHI, 2002; GUERIN et al., 2000; MARCHESE et al., 2000; SCOTT, 2009; TORTORA; FUNKE; CASE, 2005; WONG et al., 2000).

Entre os inibidores da síntese proteica podem-se citar cloranfenicol, tetraciclina, aminoglicosídeos (gentamicina) e macrolídeos (eritromicina). O cloranfenicol é um antibiótico bacteriostático com amplo espectro, mas apresenta relativa toxicidade. Este antibiótico reage com a subunidade 50S, inibindo a formação de ligações peptídicas durante o alongamento da cadeia polipeptídica, impedindo a formação da proteína (BERGER-BÄCHI, 2002; TAVARES, 1996; TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

O aminoglicosídeo mais conhecido é a estreptomicina. Os aminoglicosídeos são bactericidas e também inibem a síntese proteica. A estreptomicina e a gentamicina interferem nos passos iniciais da síntese proteica, alterando a conformação da subunidade 30S no ribossomo procarioto, alterando a “leitura” do mRNA. As tetraciclina são um grupo de antibióticos de amplo espectro de ação que inibem a síntese proteica.

As tetraciclina interferem na fixação do tRNA no sítio da subunidade ribossomal 30S, impedindo a adição de aminoácidos no alongamento da cadeia polipeptídica. Os macrolídeos são antibióticos que contêm um anel lactona macrocíclico. O macrolídeo mais conhecido é a eritromicina, que atua por meio

da inibição proteica, bloqueando o alongamento da cadeia polipeptídica ao se fixar à porção 50S do ribossomo procarioto. Este antibiótico estimula a dissociação da molécula tRNA do ribossomo (BERGER-BÄCHI, 2002; MARCHESE et al., 2000; TAVARES, 1996; TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

A clindamicina é um antibiótico da classe das lincosamidas que são quimicamente distintas dos macrolídeos. Entretanto, apresentam mecanismo de ação similar na inibição da síntese proteica por meio da ligação ao receptor 23S do rRNA, que faz parte da subunidade 50S do ribossomo bacteriano, estimulando a dissociação da molécula do tRNA do ribossomo e, por fim, bloqueando a elongação da cadeia polipeptídica (LECLERCQ, 2002).

Os inibidores de ácido nucleicos são derivados das rifamicinas e quinolonas. As rifamicinas são drogas estruturalmente relacionadas aos macrolídeos e inibem a síntese de mRNA. A rifampicina é um derivado semissintético da rifampicina B, esta produzida como resultado do processo de fermentação do *Streptomyces mediterranei*, apresentando ação em diversas bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. O principal mecanismo de ação é a inibição da atividade RNA-polimerase DNA-dependente, impedindo a transcrição da fita de RNA a partir do molde de DNA (JIN; GROSS, 1988; MILLER; CRAWFORD; SHINNICK, 1994). Entre as quinolonas pode-se citar o ácido nalidíxico, que inibe seletivamente a enzima DNA girase, necessária para replicação do DNA (BERGER-BÄCHI, 2002; TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

As sulfas são inibidores da síntese de metabólitos essenciais. Em muitos microrganismos, o PABA (ácido paraminobenzoico) é substrato para uma reação enzimática que leva à síntese do ácido fólico, uma vitamina que atua como coenzima para a síntese de muitos aminoácidos e de bases púricas e pirimídicas dos ácidos nucleicos. Na presença de sulfanilamida, uma das enzimas que

normalmente convertem o PABA em ácido fólico combina-se com a droga, interrompendo a síntese do ácido fólico e, conseqüentemente, impedindo o crescimento microbiano. O sulfametoxazol inibe a síntese do ácido di-idrofólico, um intermediário do ácido fólico, a partir do PABA. Esses antimicrobianos à base de sulfas inibem competitivamente as enzimas que convertem o PABA em ácido fólico (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

O trimetoprim liga-se a outra enzima desta via metabólica, di-idrofolato redutase, o que também impede a síntese do ácido fólico (ARCHER; CLIMO, 1994; BERGER-BÄCHI, 2002; MARCHESE et al., 2000; TAVARES, 1996; TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

2.7 Teste de sensibilidade a antimicrobianos – método de difusão de discos

De modo geral, o perfil de resistência de bactérias a antibióticos tem sido comumente mensurado por meio de métodos qualitativos, como o método de difusão de discos, descrito inicialmente por Bauer et al. (1966) e aperfeiçoado segundo Clinical and Laboratory Standards Institute- CLSI (2008).

O teste de sensibilidade a antimicrobianos oferece como resultado padrões de resistência ou sensibilidade de uma amostra bacteriana específica a vários agentes antimicrobianos. O teste aceito e recomendado para rotina laboratorial é o da difusão do antibiótico em um meio de cultura sólido. Por esta técnica, uma suspensão homogênea do organismo é espalhada na superfície do meio de cultura. O antimicrobiano é impregnado em um disco de papel de filtro e, quando colocado no meio de cultura inoculado, difunde-se, formando um gradiente de concentração. A velocidade de difusão é produto da interação entre as moléculas do agente antimicrobiano e o meio. Portanto, esse processo pode ser influenciado pela quantidade de antibióticos nos discos, a densidade do gel do ágar, a difusibilidade do agente em solução aquosa, a força iônica da

composição do meio de cultura e a profundidade do ágar (WATTS; YANCE, 1994).

A zona de inibição do crescimento bacteriano que resulta é diretamente proporcional à susceptibilidade do microrganismo, desde que todas as variáveis que afetam a difusão da droga sejam mantidas constantes. O tamanho do inóculo também é uma variável que afeta a zona de inibição. Em inóculos mais concentrados, há maior chance de haver crescimento visível antes que o antimicrobiano possa se difundir ao redor do disco. Logo, o antibiograma deve ser realizado com cuidado e atenção aos detalhes da técnica (WATTS; YANCE, 1994).

2.8 Resistência bacteriana aos antimicrobianos

A descoberta dos antibióticos pode ser considerada um dos maiores avanços da medicina no século XX e sua utilização, a partir da década de 1940, contribuiu imensamente para os tratamentos das doenças bacterianas. No entanto, o uso imprudente dos antimicrobianos tem causado grande impacto na seleção de populações bacterianas resistentes (GOULD, 2008; HEUER et al., 2002; SCOTT, 2009; VIVEKANANDHAN et al., 2002).

Antibióticos são substâncias produzidas por certos microrganismos; sua síntese é natural e essas substâncias são ativas contra outros microrganismos. Alguns antibióticos podem ser modificados quimicamente após sua produção natural, sendo assim conhecidos como antibióticos semissintéticos. A denominação antibiótico é utilizada para aquele antimicrobiano produzido naturalmente e quimioterápico, ao antimicrobiano obtido sinteticamente (ATLAS, 1996).

A avaliação da resistência antimicrobiana é uma preocupação mundial, tanto para a saúde humana quanto para a saúde animal. Diversas instituições,

como a Sociedade Americana de Microbiologia e a Organização Mundial de Saúde, têm expressado apreensão em relação ao grande aumento da resistência aos antibióticos. O aparecimento e a disseminação de resistência a drogas antimicrobianas entre as bactérias são considerados sérios problemas de saúde pública (COHEN, 2000; MARTINEZ, 2009). Sempre que os antimicrobianos são utilizados de forma terapêutica para o tratamento de infecções em humanos e animais, ocorre uma pressão seletiva que favorece os genótipos resistentes aos antimicrobianos. Como consequência dessa pressão seletiva e devido ao uso indiscriminado desses antimicrobianos, ocorreu, nas últimas décadas, um aumento impressionante do nível de resistência a agentes antimicrobianos apresentado pelas bactérias que ocorrem em humanos ou em outros animais (GOULD, 2008; LEVY, 2002; TEUBER, 2001).

Martinez (2009) cita que nos últimos anos ocorreu intensa poluição ambiental por antibióticos. Os resíduos de antibióticos provenientes da utilização em humanos e animais estão alterando o equilíbrio da microbiota ambiental e a transferência horizontal de genes de resistência tem provocado forte pressão seletiva. Os mesmos genes de resistência identificados em casos clínicos estão presentes no ecossistema. Esse impacto provocado pela poluição por antibióticos traz sérios problemas à saúde humana.

A resistência das bactérias a antimicrobianos pode ser natural ou adquirida. A resistência natural é resultante das características biológicas dos microrganismos e pode ser observada em determinadas espécies bacterianas em relação a diferentes antimicrobianos. Ela pode existir devido à falta de estrutura alvo (KONEMAN et al., 1997). Bactérias Gram-negativas possuem uma camada lipopolissacarídica espessa que atua como barreira, limitando a difusão de moléculas de antibiótico dentro da célula. Já as bactérias gram-positivas apresentam substâncias lipofílicas em sua parede celular que retardam a penetração de compostos antimicrobianos hidrofílicos. Bactérias Gram-positivas

e Gram-negativas também podem produzir enzimas capazes de inibir a ação de vários antibióticos (BOWER; DAESCHEL, 1999).

Resistência adquirida a antibiótico é a habilidade adquirida por um microrganismo para resistir aos efeitos de um determinado antibiótico para o qual o microrganismo normalmente é sensível. Atualmente, esse tipo de resistência é descrito em praticamente todas as espécies bacterianas (FILE JÚNIOR, 1999, JACOBY; ARCHER, 1991; SCOTT, 2009; TAVARES, 1996).

A aquisição de resistência por uma bactéria inicialmente sensível pode ser decorrente de alterações genéticas de mutações em genes cromossômicos. A mutação cromossômica é um evento raro e espontâneo, que ocorre independente do antibiótico, que serve apenas como agente seletivo para a bactéria mutante. A resistência bacteriana adquirida também pode ocorrer pela transferência de DNA extracromossômico. Esse tipo de resistência é transmissível entre diferentes isolados de uma mesma espécie, diferentes espécies e até mesmo gêneros, promovendo aquisição de genes de uma célula doadora por meio de mecanismos de troca de material genético (ATLAS, 1996; ESPINASSE, 1993; GOULD, 2008; KONEMAN et al., 1997; MARTINEZ, 2009).

Grande parte das bactérias resistentes a antibióticos contém genes de resistência localizados em plasmídeos R. Plasmídeos são fragmentos de DNA circulares que agem independente do DNA cromossômico e podem ser transferidos de uma bactéria a outra e conferir características biológicas adicionais às bactérias, entre elas a expressão de resistência a antibióticos (ATLAS, 1996; SCOTT, 2009).

Outro elemento genético móvel de importância são os transposons que frequentemente carregam genes de resistência a antibióticos. Os transposons possuem a capacidade de mover-se de plasmídeos para o cromossomo bacteriano e vice-versa. Também são capazes de inserir-se em bacteriófagos, podendo, dessa forma, aumentar a transferência de genes de resistência entre as

células bacterianas. Além disso, transposons conjugativos são capazes de induzir o processo de conjugação, transferindo genes de uma célula doadora para receptora (BOWER; DAESCHEL, 1999; KONEMAN et al., 1997).

Determinantes de resistência também podem ser adquiridos no ambiente, ou seja, por meio de transformação, quando fragmentos de DNA originários de lise de outras células estão presentes no ambiente (GOULD, 2008; (MATEU; MARTIN, 2000).

Análises moleculares de genes de resistência a antibióticos em plasmídeos e transposons têm demonstrado que elementos idênticos são encontrados em bactérias associadas aos animais e ao homem (BLAKE et al., 2003; TEUBER, 2001).

Bactérias resistentes associadas a animais, como o gado de leite, podem contaminar o leite destinado ao consumo de seres humanos. O consumo de alimento contaminado com bactérias resistentes pode resultar na transferência de genes de resistência para bactérias patogênicas ao homem. A presença de diferentes bactérias em um mesmo ambiente também permite a transferência de genes de resistência entre as bactérias (BLAKE et al., 2003; MARTINEZ, 2009; SORUM; L'ABÉE-LUND, 2002; TEUBER, 2001).

A transferência de genes de resistência entre bactérias saprófitas e bactérias potencialmente patogênicas indica uma possível conexão entre o uso de antibióticos em animais e a resistência em patógenos de seres humanos (SORUM; L'ABÉE-LUND, 2002; TEUBER, 2001).

O fator de risco mais importante para o aumento da resistência em bactérias patogênicas é a utilização inapropriada de antibióticos em animais e em humanos. Os antibióticos são utilizados para terapia e profilaxia de doenças infecciosas. Em animais, também podem ser usados como promotores de crescimento, com o objetivo de prevenir perdas econômicas, evitando-se a morte do animal ou a diminuição da produtividade como resultado da doença, o que

tem contribuído para a disseminação e o aumento de bactérias resistentes (ANTHONY; VAN DEN BOGAARD; STOBBERINGH, 2000; MARTINEZ, 2009; SNARY et al., 2004).

A constante administração de antibióticos em animais determina grande pressão seletiva na microbiota normal e nos microrganismos patogênicos, permitindo o desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos (FARRINGTON et al., 2001; GOULD, 2008; MARTINEZ, 2009).

Segundo Benício (1996), é proibido o uso de penicilina, tetraciclina, cloranfenicol e sulfas como promotores de crescimento. Entretanto, não há fiscalização. Logo, não se sabe, realmente, quais antibióticos têm sido utilizados nas propriedades rurais brasileiras.

Diante da múltipla resistência bacteriana a diversos antibióticos, faz-se necessário promover o desenvolvimento de medidas para minimizar o uso indiscriminado dos antimicrobianos e também a produção de novos agentes. A produção de antimicrobianos segue duas estratégias. A primeira refere-se à criação de compostos análogos aos já existentes (por exemplo, as cefalosporinas vão da primeira a quarta geração) ou o desenvolvimento de novas classes de drogas. Alterações da estrutura química de um antimicrobiano existente podem evitar que fatores de resistência tenham ação sobre o novo agente antimicrobiano (TAVARES, 1996). A criação de novas classes de antimicrobianos é mais árdua, apresentando maiores dificuldades.

No ano de 2002, de 89 novos medicamentos aprovados pela FDA, não se aprovou antibacteriano algum (ACUNAL, 2003). Outro dado preocupante é o de que, de 400 novas moléculas pesquisadas pelos principais laboratórios internacionais, somente 5 são antibacterianas. As razões disso podem ser múltiplas, incluindo o efeito da rápida perda da patente, os genéricos e o aumento do interesse das indústrias por medicamentos para uso crônico, como problemas metabólicos, cardiovasculares, reumatológicos. A diminuição da

pesquisa com novos antimicrobianos é decorrente também da possibilidade de pouco êxito na descoberta de novas drogas e a rápida aquisição de resistência a antimicrobianos pelas bactérias (ACUNAL, 2003).

O tema resistência antimicrobiana tem sido debatido em diversos centros de controle e pesquisa (COHEN, 2000) e várias medidas têm sido discutidas, visando minimizar ou reverter o mecanismo de resistência bacteriana. Dentre elas podem-se citar o rodízio de antibióticos em hospitais, a associação de antibióticos, a inibição do mecanismo bioquímico da resistência e a limitação do uso de antibióticos como promotores de crescimento de animais. Entretanto, a medida mais importante é a restrição ao uso de antibióticos. O correto uso minimiza ou, até mesmo, previne o surgimento de bactérias resistentes e permite reverter o problema da resistência aos antibióticos a longo prazo (ELIOPOULOS, 2009; MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 1997; MARTINEZ, 2009).

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Alguns alimentos, como o leite, podem ser facilmente contaminados por bactérias. A falta de cuidados com a higienização de equipamentos e tanques de refrigeração pode propiciar um ambiente adequado para a adesão e o crescimento de microrganismos. Nesta pesquisa, identificaram-se bactérias psicrotróficas Gram-positivas presentes em tanques de expansão. Foram encontrados isolados de *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Corynebacterium* spp., *Corynebacterium jeikeium*, *Corynebacterium aquaticum*, *Corynebacterium bovis*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*, *Staphylococcus* spp., *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus vitulus*, *Staphylococcus saccharolyticus*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lactococcus garviae* e *Micrococcus sedentarius*.

Bactérias psicrotróficas são capazes de aderir, crescer e dominar a microbiota nos tanques de refrigeração para leite cru. Algumas bactérias psicrotróficas são também termodúricas, as quais são capazes de sobreviver a tratamentos térmicos, como a pasteurização.

As bactérias psicrotróficas são conhecidas por causarem deterioração do leite. A deterioração ocorre devido à síntese de proteases e lipases que hidrolisam proteínas e lipídeos do leite, respectivamente. A maioria dessas enzimas é estável ao calor, permanecendo ativa após a pasteurização. Os psicrotróficos Gram-positivos identificados no presente trabalho produziram proteases, lipases e lecitinases. A lecitinase foi produzida por um número menor de isolados.

Com a finalidade de evitar perdas econômicas devido à deterioração do leite, faz-se necessária a adoção de medidas que minimizem a contaminação microbiana dos equipamentos e tanques de resfriamento para leite. Entre essas medidas destacam-se a manutenção da sanidade do rebanho e a adoção de

medidas adequadas para higienização e sanificação de todos os utensílios, equipamentos e tanques de refrigeração.

Além da deterioração do leite, bactérias psicrotólicas termodúricas podem constituir problemas à saúde pública. Bactérias termodúricas patogênicas ou oportunistas, resistentes a antimicrobianos, podem ser a causa de infecções em seres humanos que consumiram leite contaminado.

Nesta pesquisa, foi observada a multirresistência a diferentes classes de antimicrobianos por bactérias psicrotólicas isoladas de tanques de refrigeração.

Bywater et al. (2004) relatam que fazendas representam um grande reservatório de bactérias que contêm genes de resistência a antibióticos.

A evolução da resistência bacteriana aos antibióticos está relacionada com o aumento do uso de antimicrobianos em hospitais e na produção animal. Adicionalmente, é difícil afirmar a extensão em que isso ocorre e o impacto da transmissão na atual disseminação da resistência em humanos (ANDREOTTI; NICODEMO, 2004; FEDORKA-CRAY et al., 2002).

O aumento da resistência bacteriana a vários agentes antimicrobianos promove dificuldades no tratamento de infecções e contribui para o aumento dos custos do sistema de saúde.

REFERÊNCIAS

ACUNAL, G. Evolución de la terapia antimicrobiana: lo que era, lo que es y lo que será. **Revista Chilena de Infectología**, Santiago, v. 20, p. 7-10, 2003. Supl. 1.

AKUTSU, C. K. **Adesão de esporos de *Bacillus sporothermodurans* ao aço inoxidável e sua resistência a sanificantes químicos em condições de uso simulado**. 2001. 82 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2001.

AMARO, F. et al. Brazilian national milking machines and cooling tanks standards. In: CONGRESSO PANAMERICANO DE CONGRESSO DO LEITE E CONTROLE DE MASTITE, 2., 2002, Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto, 2002. p. 154.

ANDREOTTI, R.; NICODEMO, M. L. F. **Uso de antimicrobianos na produção de bovinos e desenvolvimento de resistência**. Campo Grande: EMBRAPA, 2004. 50 p.

ANDREWES, P. et al. Detection of lipase in skim and whole milk powders using triheptanoin as a substrate. **International Dairy Journal**, Barking, v. 17, n. 6, p. 3, June 2006.

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

ARCHER, G. L.; CLIMO, M. W. Antimicrobial susceptibility of coagulase negative staphylococci. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, Washington, v. 38, n. 10, p. 2231-2237, 1994.

ATLAS, R. M. **Principles of microbiology**. 2nd ed. New York: McGraw-Hill, 1996. 1298 p.

BANARD, S. E. Extending the keeping quality of fluid milk to 21 days. **Dairy Food and Environmental Sanitation**, Ames, v. 15, p. 12-16, 1995.

BAUER, A. W. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, Baltimore, 45, p. 493-496, 1966.

BELITZ, H. D.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. **Food Chemistry**. 3rd ed. Berlin: Springer, 2004. 1070 p.

BENÍCIO, L. A. S. Restrições e o uso de aditivos (promotores de crescimento em rações de aves: visão da indústria. In: CONFERÊNCIA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1996, São Paulo. **Anais...** São Paulo, 1996. p. 17-26.

BERGER, F. O. et al. Cold shock and cold acclimation proteins in the psychrotrophic bacterium *Arthrobacter globiformis* SI55. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 178, n. 11, p. 2999-3007, 1996.

BERGER-BÄCHI, B. Resistance mechanisms of Gram-positive bacteria. **International Journal of Medical Microbiology**, Würzburg, v. 292, p. 27-35, 2002.

BLAKE, D. P. et al. Transfer of antibiotic resistance between comensal and pathogenic members of the *Enterobacteriaceae* under ileal conditions. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 95, p. 428-436, 2003.

BOOR, K. J. et al. Microbiological and chemical quality of raw milk in New York State. **Journal of Dairy Science**, Champaign, n. 6, v. 81, p. 1743-1748, 1998.

BOWER, C. K.; DAESCHEL, M. A. Resistance responses of microorganisms food environments. **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 51, de 20 de setembro de 2002. Aprova os regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite A, B e C. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, DF, 18 set. 2002. Seção 1.

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.

BRITO, J. R. F.; BRITO, M. A. V. P. Qualidade higiênica do leite. **Revista Clube Valeu Vallée**, São Paulo, n. 10, p. 4-6, 2002.

BRITO, J. R. F. et al. Adoção de boas práticas agropecuárias em propriedades leiteiras da Região Sudeste do Brasil como um passo para a produção de leite seguro. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 32, n. 2, p. 125-131, 2004.

BYWATER, R. et al. European survey of antimicrobial susceptibility among zoonotic and comensal bacteria isolated from food-producing animals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v. 54, p. 744-754, 2004.

CARREIRA, R. L. et al. Analysis of peptide profiles of casein hydrolysates prepared with pepsin, trypsin and subtilisin. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, Buenos Aires, v. 23, p. 17-25, 2004.

CARVALHO, E. P. **Microbiologia de alimentos**. 2001. 128 p. Monografia (Especialização em Processamento e Controle de Qualidade em Carne, Leite, Ovos e Pescado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001.

CHAMBERS, J. V. The microbiology of raw milk. In: ROBINSON, R. K. (Ed.) **Dairy microbiology handbook**. New York: Wiley Interscience, 2002. p. 39-90.

CHEN, L. COOLBEAR, T.; DANIEL, R. M. Characteristics of proteases and lipases produced by seven *Bacillus* sp. Isolated from milk powder production lines. **International Dairy Journal**, Barking, v. 14, p. 495-504, 2004.

CHEN, L.; COOLBEAR, T.; DANIEL, R. M. Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. **International Dairy Journal**, Barking, v. 13, p. 255-275, 2003.

CHENG, G. et al. Inhibition of bacterial adhesion and biofilm formation on zwitterionic surfaces. **Biomaterials**, New York, n. 28, v. 29, p. 4192-4199, 2007.

CHYE, F. Y.; ABDULLAH, A.; AYOB, M. K. Bacteriological quality and safety of raw milk in Malaysia. **Food Microbiology**, London, v. 21, p. 535-541, 2004.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**: 18 Informational supplement. 2008. Disponível em: <<http://www.clsi.org/source/orders/free/m100-s20.pdf>>. Acesso em: 15 abr. 2009.

COHEN, M. L. Changing patterns of infectious disease. **Nature**, London, v. 406, p. 762-767, 2000.

COLLINS, E. B. Heat resistant psychrotrophic microorganisms. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 64, p. 157-160, 1981.

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

COUSIN, M. A.; BRAMLEY, A. J. The microbiology of raw milk In: ROBINSON, R. K. **Dairy microbiology**. New York: Applied Science, 1981. p. 119-163, v. 1.

CROMIE, S. Psychrotrophs and their enzymes residues in cheese milk. **Australian Journal of Dairy Technology**, Victoria, v. 47, n.2, p. 96-100, Nov. 1992.

DATTA, N.; DEETH, H. C. Diagnosing the cause of proteolysis in UHT milk. **Food Science Technology**, London, v. 36, p. 173-182, 2003.

DEMASURE, N.; GUEGUEN, M. Monitoring the microbiology of high quality milk by monthly sampling over 2 years. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 64, p. 271-280, 1997.

DIAS, D. R. **Uso de protease de *Bacillus* spp. na hidrólise protéica de farinha de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)**. 2007. 144 p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

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

ELIOPOULOS, G. M. Increasing problems in the therapy of enterococcal infections. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, Berlin, n. 12, p. 409-412, 1993.

ELIOPOULOS, G. M. Microbiology of drugs for treating multiply drug-resistant Gram-positive bacteria. **Journal of Infection**, London, v. 59, n. 1, p. 17-24, 2009.

ELMOSLEMANY, A. M. The association between bulk tank milk analysis for raw milk quality and on-farm management practices. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 95, p. 32-40, 2010.

ELMOSLEMANY, A. M. et al. Risk factors for bacteriological quality of bulk tank milk in Prince Edward Island dairy herds. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 92, p. 2644-2652, 2009.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Estatísticas do leite**. Juiz de Fora, 2007. Disponível em: <Erro! A referência de hiperlink não é válida.>. Acesso em: 12 abr. 2010.

ENEROTH, A. et al. Critical contamination sites in the production line of pasteurised milk, with reference to the psychrotrophic soilage flora. **International Dairy Journal**, Barking, v. 8, n. 9, p. 826-834, 1998.

ERCOLINI, D. et al. Molecular identification of mesophilic and psychrotrophic bacteria from raw cow's Milk. **Food Microbiology**, London, v. 26, p. 228-231, 2009.

ESPINASSE, J. Responsible use of antimicrobials in veterinary medicine: perspectives in France. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 35, p. 289-301, 1993.

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.

FANG, W.; SANDHOLM, M. Inhibition of the proteinase activity in mastitic Milk. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 62, n. 1, p. 61-68, 1995.

FARRINGTON, L. A. et al. Prevalence of antimicrobial resistance in *Salmonellae* isolated from market-age swine. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 64, p. 1496-1502, 2001.

FEDORKA-CRAY, P. J. et al. Programs for monitoring antimicrobial resistance. **Animal Biotechnology**, New York, v. 13, n. 1, p. 43-55, 2002.

FILE JÚNIOR, T. M. Overview of resistance in the 1990s. **Chest Journal**, Northbrook, v. 115, p. 3-8, 1999.

FRANK, J. F.; CHRISTEN, G. L.; BULLERMAN, L. B. Tests for groups of microorganisms. In: MARSHALL, R. T. **Standard methods for the examination of dairy products**. Washington: American Public Health, 1992. p. 271-286.

GINGER, M. R.; GRIGOR, M. R. Comparative aspects of Milk casein. Comparative Biochemistry and Physiology. **Biochemistry & Molecular Biology**, New York, v. 124, p. 133-145, 1999. Part B.

GOULD, I. M. The epidemiology of antibiotic resistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 32, p. 2-9, 2008.

GUERIN, F. et al. Outbreak of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to glycopeptides in a Parisian hospital. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, n. 8, p. 2985-2988, 2000.

GUERREIRO, P. K. et al. Qualidade microbiológica de leite em função de técnicas profiláticas no manejo de produção. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n.1, p. 216-222, jan./ fev. 2005.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Methods for detection and characterization of lipases: a comprehensive review. **Biotechnology Advances**, Amsterdam, v. 27, p. 782-798, 2009.

HAYES, M. C.; BOOR, K. Raw milk and fluid milk products. In: MUNSCH-ALATOSSAVA, P.; ALATOSSAVA, T. Phenotypic characterization of raw milk-associated psychrotrophic bacteria. **Microbiological Research**, Copenhagen, v. 161, p. 334-346, 2006.

HEUER, H. et al. Gentamicin resistance genes in environmental bacteria: prevalence and transfer. **FEMS Microbiology Ecology**, Birmingham, 1404, p. 1-14, 2002.

HOLM, C. et al. Predominant microflora of downgraded Danish bulk tank milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 87, n. 5, p. 1151-1157, May 2004.

JACOBY, G. A.; ARCHER, G. A. New mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 324, n. 9, p. 601-612, 1991.

JAEGER, K. E. et al. Bacterial lipases. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 15, n. 1, p. 29-63, 1994.

JAOUEN, T. et al. Pore size dependence on growth temperature is a common characteristic of the major membrane protein OprF in psychrotrophic and mesophilic *Pseudomonas* species. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, n. 11, p. 6665-6669, 2004.

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

JIN, D. J.; GROSS, C. A. Mapping and sequencing of mutations in the *Escherichia coli rpoB* gene that lead to rifampicin resistance. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 202, p. 45-48, 1988.

KELLY, A. L.; FOX, P. F. Indigenous enzymes in milk: A synopsis of future research requirements. **International Dairy Journal**, Barking, v. 16, p. 707-715, 2006.

KOHLMANN, K. L. et al. Production of proteases by psychrotrophic microorganisms. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 74, n. 10, p. 3275-3283, 1991.

KONEMAN, E. W. et al. **Color atlas and textbook of diagnostic microbiology**. 5th ed. Philadelphia: Lippincott, 1997. 1395 p.

KUMAR, G. S.; JAGANNADHAM, M. V.; RAY, M. V. Low-Temperature-Induced changes in composition and fluidity of lipopolysaccharides in the Antarctic psychrotrophic bacterium *Pseudomonas syringae*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 184, n. 23, p. 6746-6749, 2002.

LAW, B. A. Reviews of the progress of dairy science: enzymes of psychrotrophic bacteria and their effects on milk and milk products. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 46, n. 3, p. 573-588, 1979.

LAW, B. A.; ANDREWS, A. T.; SHARPE, A. E. Gelation from ultra-high-temperature-sterilized milk by proteases from a strain of *Pseudomonas fluorescens* isolated from raw milk. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 44, n. 1, p. 145-148, Jan. 1977.

- LECLERCQ, R. Mechanisms of resistance of macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 34, n. 4, p. 482-92, 2002.
- LEVY, S. B. **The antibiotic paradox**: how the misuse of antibiotics destroys their curative powers. 2nd ed. Cambridge: Perseus, 2002.
- LOURENÇO, E. J. **Tópicos de proteínas de alimentos**. Jaboticabal: FUNEP, 2000. 344 p.
- MACRAE, A. R. **Extracellular microbial lipases**. London: Applied Science, 1983. p. 225-249.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Biology of microorganisms**. 8th ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1997. 986 p.
- MANZANO, S. et al. 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**, Barking, v. 15, n. 1, p. 79-84, Jan. 2004.
- MARCHESE, A. et al. Heterogeneous vancomycin resistance in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated in a large Italian hospital. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, n.2, p. 866-869, 2000.
- MARSHALL, D. L.; SCHMIDT, R. T. Growth of *Listeria monocytogenes* at 10°C in milk freeinoculate with selected pseudomonads. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 51, n.4, p. 227-282, Apr. 1998.
- MARTINEZ, J. L. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. **Environmental Pollution**, Barking, v. 157, p. 2893-2902, 2009.
- MARTINS, M. L. et al. 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**, Berlin, v. 48, n. 8, p. 569-581, Oct. 2001.

- MILLER, L. P.; CRAWFORD, J.T.; SHINNICK, T.M. The *rpoB* gene of *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 38, p. 805-811, 1994.
- MILLOGO, V. et al. Raw Milk hygiene at farms, processing units and local markets in Burkina Faso. **Food Control**, Vurrey, v. 21, p. 1070-1074, 2010.
- MORENO, I. et al. Modificações da proteína do leite no processamento de queijos. **Revista Indústria de Laticínios**, São Paulo, v. 26, p. 44-49, 2000.
- MOTTAR, J. Heat resistant enzyme in UHT milk and influence on sensoric changes during incooled storage. **Milchwissenschaft**, Munich, v. 36, n. 2, p. 87-91, 1981.
- NERO, L. A. et al. Leite cru de quatro regiões leiteiras brasileiras: perspectivas de atendimento dos requisitos microbiológicos estabelecidos pela Instrução Normativa 51. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 1, p. 191-195, 2005.
- NERO, L. A.; VIÇOSA, G. N.; PEREIRA, F. E. V. Qualidade microbiológica do leite determinada por características de produção. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 2, p. 386-390, 2009.
- NÖRNBERG, M. F. B. L. et al. Proteolytic activity among psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk. **International Journal of Dairy Technology**, Amsterdam, v. 63, n. 1, p. 41-46, 2010.
- OHKI, R. et al. Transcriptional termination control of a novel ABC transporter gene involved in antibiotic resistance in *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 187, n. 17, p. 5946-5954, 2005.
- ORDÓÑEZ, J. **Tecnologia de alimentos: alimentos de origem animal**. Porto Alegre: Artmed, 2005. 279 p.
- O'TOOLE, G.; KAPLAN, H. B.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 54, p. 49-79, 2000.
- OULAHAL, N. et al. Quantitative analysis of survival of *Staphylococcus aureus* or *Listeria innocua* on two types of surfaces: polypropylene and stainless steel in contact with three different dairy products. **Food Control**, Vurrey, v. 19, p. 178-185, 2008.

PINTO, C. L. O.; CARDOSO, R. R.; VANETTI, M. C. D. As psicrotróficas proteolíticas e potencial deteriorador a temperaturas de refrigeração. **Revista do Instituto de Laticínios Candido Tostes**, Juiz de Fora, v. 58, p. 49-54, 2003.

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

PORETTI, M. Quality control of water as raw material in food industry. **Food Control**, Vurrey, v. 1, p. 79-83, 1990.

PRATA, L. F. **Fundamentos de ciência do leite**. São Paulo: UNESP; FUNEP, 2001. 287 p.

PRICE, N. C.; STEVENS, L. **Fundamentals of enzymology**. 3rd ed. Bath: Oxford University, 1993. 486 p.

ROGICK, F. A. Produção higiênica do leite. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 37, p. 25-27, 1982.

ROLLEMA, H. S. Casein association and micelle formation. In: FOX, P.; MCSWEENEY, P. (Ed.). **Advanced dairy chemistry: proteins**. 3rd ed. London: Balckie, 1992. v. 1, cap. 3, p. 111-140.

ROMAN, J. A. **Propriedades físico-químicas, nutritivas e funcionais da caseína de leite bovino obtida por diferentes processos**. 2002. 176 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

ROWE, M. T. et al. 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.

RUSSEL, N. J.; NICHOLS, D. S. Polyunsaturated fatty acids in marine bacteria: dogma rewritten. **Microbiology**, Spencers Wood, v. 145, p. 767-779, 1999.

SANTOS, E. S.; CARVALHO, E. P.; ABREU, L. R. Psicrotróficos: consequências de sua presença em leites e queijos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 33, n. 22, p. 129-138, jul./dez. 1999.

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

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. **Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite**. São Paulo: Manole, 2007. 314 p.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. Importância e efeito de bactérias psicotróficas sobre a qualidade do leite. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 15, n. 82, p. 13-19, 2001.

SAUER, K. et al. *Pseudomonas aeruginosa* Displays Multiple Phenotypes during Development as a biofilm. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 184, p. 1140-1154, 2002.

SCOTT, G. Antibiotic resistance. **Medicine**, Oxford, v. 37, n. 10, p. 551-556, 2009.

SHARMA, M.; ANAND, S. K. Biofilms evaluation as na essential component of HACCP for food/dairy processing industry? A case. **Food Control**, Vurrey, v. 13, n. 6/7, p. 469-477, 2002.

SILVA, G. A. V. **Avaliação das condições de obtenção do leite e da ação de sanificantes no tanque de expansão em uma propriedade leiteira do município de Candeias/ Bahia- Estudo de caso**. 2006. 86 p. Dissertação (Mestrado em Alimentos, Nutrição e Saúde da Escola de Nutrição) - Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2006.

SILVEIRA, I. A.; CARVALHO, E. P.; TEIXEIRA, D. Influência de microrganismos psicotróficos sobre a qualidade do leite refrigerado: uma revisão. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 12, n. 55, p. 21-27, 1998.

SMITH, J. L.; FRATAMICO, P. M.; NOVAK, J. R. Quorum sensing: a primer for food microbiologists. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 67, n. 5, p. 1053-1070, 2004.

SNARY, E. L. et al. Antimicrobial resistance: a microbial risk assessment perspective. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v. 53, p. 906-917, 2004.

SORHAUG, T.; STEPANIAK, L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: quality aspects. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 8, n. 2, p. 35-41, 1997.

SORUM, H.; L'ABEE-LUND, T. M. Antibiotic resistance in food-related bacteria- a result of interfering with the global web of bacterial genetics. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, 78, p. 43-56, 2002.

STEAD, D. Production of extracellular lipases and proteinases during prolonged growth of strains of psychrotrophic bacteria in whole milk. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 54, n. 4, p. 535-543, 1987.

STEPANIAK, L. *Yersinae* other than *Pseudomonas* spp. In: ROGINSKI, H.; FUQUAY, J. M.; FOX, P. F. **Encyclopedia of dairy science**. London: Academic, 2000. v. 1, p. 2345-2351.

TAVARES, W. Bactérias Gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 33, n. 3, p. 281-301, 2000.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos**. 2nd ed. São Paulo: Atheneu, 1996. 792 p.

TEUBER, M. Veterinary use and antibiotic resistance. **Current Opinion in Microbiology**, New York, v. 4, p. 493-499, 2001.

TONDO, E. C. et al. 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.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 894 p.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS. Biblioteca da UFLA. **Manual de normalização e estrutura de trabalhos acadêmicos**: TCC, monografias, dissertações e teses. Lavras, 2010. Disponível em: <http://www.biblioteca.ufla.br/site/index.php>. Acesso em: 10 maio 2010.

VALEEVA, N. I. et al. Improving food safety at the dairy farm level: farmers' and expert's perceptions. **Review of Agricultural Economics**, Lexington, v. 27, n. 4, p. 574-592, 2005.

VALERIANO, C. **Identificação e caracterização de bactérias psicrotróficas gram-negativas isoladas de tanques de refrigeração por expansão.** 2007. 41 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

VIVEKANANDHAN, G. et al. 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.

VULFSON, E. N. Industrial applications of lipases, 1994. IN: CHEN, L.; DANIEL, R. M.; COOLBEAR, T. Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. **International Dairy Journal**, Barking, v. 13, p. 255-275, 2003.

WALSTRA, P. On the stability of casein micelles. **International Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 73, n. 8, p. 1965-1979, 1990.

WATTS, J. L.; YANCEY, R. J. An update on antimicrobial susceptibility testing of mastitis pathogens. In: NATIONAL MASTITIS COUNCIL ANNUAL MEETING, 33., 1994, Orlando. **Proceedings...** Arlington, 1994. p. 14-19.

WHITTAKER, J. R. **Principles of enzymology for the food sciences.** 2nd ed. California: Marcel Decker, 1994. 648 p.

WILHELM, M. P.; ESTES, L. Vancomycin. **Mayo Clinic Proceedings**, Rocheste, v. 74, p. 928-935, 1999.

WONG, D. W. S. **Food enzymes: structures and mechanism.** New York: Chapman & Hall, 1995. 390 p.

WONG, S. S. Y. et al. Bacteremia due to *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility vancomycin. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 36, p. 261-268, 2000.

WRIGHT, A. J. The penicillins. **Mayo Clinic Proceedings**, Rocheste, v. 74, p. 290-307, 1999.

ZHAO, S. et al. Antimicrobial-resistant *Salmonella* serovars isolated from imported foods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 84, n. 1, p. 87-92, 2003.

CAPÍTULO 2

Bactérias psicrotróficas Gram-positivas em tanques de refrigeração de leite cru: identificação bioquímica e produção de enzimas extracelulares

1 INTRODUÇÃO

A estocagem do leite cru refrigerado no local de produção teve início, no Brasil, na década de 1990, sendo regulamentada em 2002 pelo Ministério da Agricultura. A refrigeração do leite evita perdas devido à atividade de bactérias mesofílicas acidificantes, entretanto, o armazenamento refrigerado pode favorecer o crescimento de bactérias psicrotróficas. Microrganismos psicrotróficos apresentam a capacidade de crescer em temperaturas de refrigeração, passando de minoria a maioria da população presente no leite.

O crescimento de bactérias psicrotróficas durante a armazenagem refrigerada resulta em perda da qualidade do leite e seus derivados, devido à atividade enzimática extracelular dessas bactérias. Durante o armazenamento refrigerado, as bactérias psicrotróficas sintetizam proteases e lipases termorresistentes. O tratamento térmico, como a pasteurização, elimina a maioria das bactérias psicrotróficas. No entanto, não inativa as enzimas termorresistentes que continuam a atuar após o tratamento térmico.

Essas enzimas permanecem ativas mesmo após o tratamento térmico, provocando a deterioração do leite e seus derivados, alterando o sabor, o odor e a textura.

Para evitar perdas, o leite precisa apresentar boa qualidade *in natura* e deve ser obtido e manuseado de forma adequada, nas melhores condições higiênicas. Os equipamentos, utensílios e tanques de resfriamento devem estar sempre limpos e devidamente sanificados.

Falhas nesses procedimentos podem acarretar a adesão e o desenvolvimento de bactérias nas paredes de equipamentos e tanques de expansão. Os tanques de expansão por refrigeração têm sido apontados como um dos principais pontos de contaminação do leite. As bactérias psicotróficas aderidas à superfície desses tanques são capazes de crescer em temperaturas de refrigeração, provocando a deterioração do leite neles armazenados.

A deterioração do leite provocada por protease e lipase sintetizadas por bactérias psicotróficas Gram-positivas motivou a realização deste trabalho, cujos objetivos foram realizar a identificação de bactérias psicotróficas Gram-positivas presentes em tanques comunitários para refrigeração de leite cru e caracterizar essas bactérias com relação à capacidade de produção de proteases, lipases e lecitinases.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Isolamento e identificação bioquímica de bactérias psicrotóficas

Este trabalho foi realizado por meio da análise de bactérias pertencentes à coleção de psicrotóficos isolados de leite do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

Foram coletadas, previamente, amostras em 32 tanques de expansão comunitários situados nas cidades de Aguanil, Boa Esperança, Campo Belo, Candeias, Coqueiral e Nepomuceno, no estado de Minas Gerais. As coletas foram realizadas entre março e novembro de 2006. O material foi coletado da parede dos tanques, logo após sua higienização, usando suabes estéreis. As amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas e transportadas ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos da UFLA, para a realização das análises.

O plaqueamento de alíquotas das diluições adequadas das amostras foi realizado em ágar tripitycaseína (TSA) (Biolife, Milão-Itália), com incubação a 7°C, durante 7 a 10 dias. Os isolados foram purificados utilizando-se Ágar TSA e, posteriormente, foram submetidos aos testes de coloração de Gram, produção de catalase, oxidase. Os isolados purificados foram estocados em meio de congelamento.

A identificação bioquímica dos isolados Gram-positivos foi realizada por meio do kit de identificação BBL Crystal Gram-Positive ID (Becton, Dickinson and Company, USA). Para a identificação, foi realizada a reativação em ágar TSA, com incubação a 28°C, por 24 horas. Colônias foram diluídas em solução fornecida pelo fabricante para a padronização da turbidez, equivalente ao padrão de McFarland nº 5. Os inóculos foram distribuídos nas galerias do kit

BBL Crystal Gram-Positive ID, sendo incubados a 28°C e analisados após 24 e 48 horas, seguindo-se as orientações do manual do fabricante.

2.1.1 Especificações do Kit BBL

O kit BBL Crystal GP ID contém 29 poços com substratos para provas bioquímicas e enzimáticas. Esse sistema inclui testes para fermentação, oxidação, degradação e hidrólise de vários substratos. Uma suspensão bacteriana é utilizada para reidratar os substratos. Após um período de incubação, os poços são analisados relativamente à existência de alterações de cor ou à presença de fluorescência, consequência das atividades metabólicas dos microrganismos. O padrão das 29 reações é convertido num número de perfil com 10 dígitos, que é utilizado como base de identificação. Os testes utilizados são descritos a seguir.

- a) Testes baseados na hidrólise enzimática da ligação amida ou glicosídica. A hidrólise provoca liberação de derivado da cumarina fluorescente.
4MU- β -D-glucosídeo, valina -AMC, L-fenilalanina-AMC, 4MU- α -D-glucosídeo, L-ácido piroglutâmico-AMC, L-triptofano-AMC, L-arginina, 4MU-N-acetil- β -D-glicosaminida, fosfato, 4MU- β -D-gluconico, isoleucina.
- b) Testes baseados na utilização de hidratos de carbono. A utilização de hidratos de carbono origina a diminuição do pH e a alteração do indicador (vermelho de fenol).
Trealose, lactose, metil- α & β -glucosídeo, sacarose, manitol, maltotriose, arabinose, glicerol, frutose.
- c) Hidrólise enzimática do glicosídeo substituído por aril incolor. Essa hidrólise liberta o p-nitrofenol amarelo.
p-nitrofenil- β -D-celobiosídeo e p-nitrofenil- β -D-glucosídeo.

- d) Hidrólise enzimática do substrato amida. Essa hidrólise liberta a p-nitroanilina de cor amarela.
prolina & leucina-p-nitroanilida.
- e) Hidrólise enzimática do glicosídeo substituído por aril incolor. Essa hidrólise libera o p-nitrofenol amarelo.
p-nitrofenil-fosfato, p-nitrofenil- α -D-maltósídico, o-nitrofenil- β -D-galactose e p-nitrofenil- α -D-galactose.
- f) Hidrólise da ureia. Essa hidrólise associada à amônia resultante altera a cor do indicador de pH (azul de bromotimol).
Ureia
- g) Hidrólise da esculina. Na presença do íon férrico, a hidrólise da esculina produz precipitado de cor preta.
Esculina
- h) Utilização da arginina. A utilização da arginina origina um aumento do pH e a alteração de cor do indicador (violeta de bromocresol).

A listagem de bactérias Gram-positivas identificadas pelo Kit BBL encontra-se na Figura 1.

BBL CRYSTAL GP 同定検査キット同定可能菌種一覧

Actinomyces pyogenes	Corynebacterium kutscheri	Gemella species (<i>G. haemolyans</i> , <i>G. morbillorum</i> を含む)	Micrococcus lylae	Staphylococcus cohnii ssp urealyticum	Streptococcus constellatus
Aerococcus species (<i>A. urinae</i> , <i>A. viridans</i> を含む)	Corynebacterium propinquum		Micrococcus roseus	Staphylococcus epidermidis	Streptococcus cricetus ¹
Aerococcus urinae	Corynebacterium pseudodiphtheriticum	Globicatella sanguis	Micrococcus sedentarius	Staphylococcus epidermidis	Streptococcus citrea
Aerococcus viridans	Corynebacterium pseudodiphtheriticum	Helicococcus kunzili	Micrococcus species	Staphylococcus equorum	Streptococcus dysgalactiae
Alloioococcus orthidis ¹	Corynebacterium pseudodiphtheriticum	Lactococcus garviraeae	(<i>M. kristinae</i> , <i>M. lutrus</i> , <i>M. lyiae</i> , <i>M. roseus</i> , <i>M. sedentarius</i> を含む)	Staphylococcus gallinarum	Streptococcus equi ¹
Arcanobacterium haemolyticum ¹	Corynebacterium pseudotuberculosis	Lactococcus lactis ssp cremoris	Oerskovia species (<i>O. turbata</i> , <i>O. xanthineolytica</i> を含む)	Staphylococcus haemolyticus	(<i>S. equi</i> ssp <i>equi</i> , <i>S. equi</i> ssp <i>zooepidemicus</i> を含む)
Bacillus brevis	Corynebacterium renale group	Lactococcus lactis ssp horidiae	Paenibacillus alvei	Staphylococcus hominis	Streptococcus equi ssp <i>equi</i>
Bacillus cereus	Corynebacterium renale group	Lactococcus lactis ssp lactis	Paenibacillus macerans	Staphylococcus intermedius	Streptococcus equi ssp <i>zooepidemicus</i>
Bacillus circulans	Corynebacterium species (<i>C. aquaticum</i> , <i>C. bovis</i> , <i>C. kutscheri</i> , <i>C. propinquum</i> , <i>C. pseudodiphtheriticum</i> , <i>C. pseudotuberculosis</i> , <i>C. renale</i> group, <i>C. striatum</i> , <i>C. ulcerans</i> を含む)	Lactococcus raffinosus	Pediococcus damnosus	Staphylococcus intermedius	Streptococcus equi ssp <i>zooepidemicus</i>
Bacillus coagulans	Corynebacterium species (<i>C. aquaticum</i> , <i>C. bovis</i> , <i>C. kutscheri</i> , <i>C. propinquum</i> , <i>C. pseudodiphtheriticum</i> , <i>C. pseudotuberculosis</i> , <i>C. renale</i> group, <i>C. striatum</i> , <i>C. ulcerans</i> を含む)	Lactococcus species (<i>L. lactis</i> ssp <i>cremoris</i> , <i>L. lactis</i> ssp <i>horidiae</i> , <i>L. lactis</i> ssp <i>lactis</i> , <i>L. raffinosus</i> を含む)	Pediococcus parvulus	Staphylococcus kitoosii	Streptococcus equinus
Bacillus licheniformis	Corynebacterium ulcerans	Leuconostoc lactis	Pediococcus pentosaceus	Staphylococcus lentus	Streptococcus gordonii
Bacillus megaterium	Corynebacterium ulcerans	Leuconostoc citreum	(<i>P. damnosus</i> , <i>P. parvulus</i> , <i>P. pentosaceus</i> を含む)	Staphylococcus lugdunensis	Streptococcus intermedium
Bacillus pumilus	Corynebacterium striatum	Leuconostoc mesenteroides	Rhodococcus equi	Staphylococcus pasteurii ¹	Streptococcus milleri group (<i>S. anginosus</i> , <i>S. constellatus</i> , <i>S. intermedius</i> を含む)
Bacillus species (<i>B. brevis</i> , <i>B. circulans</i> , <i>B. coagulans</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>B. pumilus</i> , <i>B. sphaericus</i> , <i>B. alvei</i> , <i>B. macerans</i> を含む)	Corynebacterium striatum	Leuconostoc mesenteroides ssp <i>mesenteroides</i>	Rathia dentocariosa ¹	Staphylococcus pasteurii ¹	Streptococcus mutans group (<i>S. mutans</i> , <i>S. oralis</i> を含む)
Bacillus subtilis	Enterococcus avium	Leuconostoc	Staphylococcus aureus	Staphylococcus schleiferi	Streptococcus mutans group (<i>S. cricetus</i> , <i>S. mutans</i> , <i>S. sobrinus</i> を含む)
Bacillus sphaericus	Enterococcus casseliflavus/gallinarum	Pseudomonas/enteroides	Staphylococcus aureus	Staphylococcus schleiferi (<i>S. schleiferi</i> ssp <i>coagulans</i> , <i>S. schleiferi</i> ssp <i>schleiferi</i> を含む)	Streptococcus oralis
Bacillus subtilis	Enterococcus durans	Leuconostoc	Staphylococcus aureus	Staphylococcus scituri	Streptococcus oralis
Corynebacterium aquaticum	Enterococcus faecalis	Leuconostoc mesenteroides	Staphylococcus aureus	Staphylococcus simulans	Streptococcus pyogenes
Corynebacterium aquaticum	Enterococcus faecium	Leuconostoc mesenteroides	Staphylococcus aureus	Staphylococcus vitulus	Streptococcus pyogenes
Corynebacterium diphtheriae (<i>C. diphtheriae</i> ssp <i>gravis</i> , <i>C. diphtheriae</i> ssp <i>mitis</i> , <i>C. diphtheriae</i> ssp <i>intermedius</i> を含む)	Enterococcus hirae	Leuconostoc mesenteroides	Staphylococcus aureus	Staphylococcus warneri	Streptococcus pneumoniae
Corynebacterium genitalium	Enterococcus raffinosus	Leuconostoc mesenteroides	Staphylococcus caprae	Staphylococcus xylosum	Streptococcus porcinus
Corynebacterium jeikeium	Erysipelothrix rhusiopathiae	Leuconostoc mesenteroides	Staphylococcus carnosus	Staphylococcus xylosum	Streptococcus porcinus
	Gardnerella vaginalis	Leuconostoc mesenteroides	Staphylococcus carnosus	Staphylococcus xylosum	Streptococcus pyogenes
	Gemella haemolyans	Leuconostoc mesenteroides	Staphylococcus carnosus	Staphylococcus xylosum	Streptococcus salivarius group (<i>S. salivarius</i> , <i>S. vestibularis</i> を含む)
	Gemella morbillorum	Listeria grayi ¹	Staphylococcus carnosus	Staphylococcus xylosum	
		Listeria ivanovii ssp <i>ivanovii</i>	Staphylococcus carnosus	Staphylococcus xylosum	
		Listeria monocytogenes	Staphylococcus carnosus	Staphylococcus xylosum	
		Listeria murrayi	Staphylococcus carnosus	Staphylococcus xylosum	
		Micrococcus kristinae	Staphylococcus carnosus	Staphylococcus xylosum	
		Micrococcus luteus	Staphylococcus carnosus	Staphylococcus xylosum	

Figura 1: **Bactéria Gram-positiva passíveis de identificação pelo Kit BBL Crystal Gram-positiva**

2.2 Produção de enzimas extracelulares

A produção de enzimas extracelulares foi avaliada pelo teste de difusão em ágar. A produção de proteases foi determinada em meio ágar leite (Difco, França), suplementado com 5% de leite em pó, com incubação, a 28°C, por 3 dias (ALATOSSAVA; ALATOSSAVA, 2006; DOGAN; BOOR, 2003). A atividade proteolítica foi avaliada pela formação de halos claros ao redor das colônias.

A atividade da lipase extracelular foi avaliada tendo como substrato a tributirina. Esse meio consiste de ágar base tributirina (Himedia, Índia) suplementado com tributyrin (Himedia, Índia), adicionado de solução de púrpura de bromocresol 1,5%. As placas foram incubadas, a 28°C, por 3 dias (ALATOSSAVA; ALATOSSAVA, 2006; BRAUN; BALZER; FEHLHABER, 2000). A lipólise foi observada pela formação de uma zona clara ao redor da colônia.

A detecção de fosfolipases (lecitinases) foi determinada em ágar TSA, suplementado com 10% de emulsão de gema de ovo, incubado, a 28°C, por 3 dias (ALATOSSAVA; ALATOSSAVA, 2006; DOGAN; BOOR, 2003). A atividade das lecitinases foi detectada pela formação de uma zona opaca ao redor das colônias.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Identificação dos isolados gram-positivos

Foram identificadas 53 bactérias psicrotróficas Gram-positivas pertencentes a diferentes gêneros, como *Bacillus*, *Enterococcus*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Lactococcus* e *Micrococcus* (Tabela 1). Bactérias do gênero *Bacillus* foram predominantes, totalizando 43% dos isolados.

Tabela 1 Identificação de bactérias Gram-Positivas presentes na superfície de tanques de refrigeração por expansão, coletadas no sul de Minas Gerais

Gênero/espécie	Número de Isolados	Gênero/espécie	Número de isolados
<i>Bacillus subtilis</i>	20	<i>Enterococcus durans</i>	1
<i>Corynebacterium</i> spp.	9	<i>Staphylococcus simulans</i>	1
<i>Enterococcus faecalis</i>	6	<i>Staphylococcus vitulus</i>	1
<i>Corynebacterium jeikeium</i>	3	<i>Staphylococcus saccharolyticus</i>	1
<i>Bacillus licheniformis</i>	3	<i>Staphylococcus</i> spp.	1
<i>Corynebacterium aquaticum</i>	1	<i>Micrococcus sedentarius</i>	1
<i>Corynebacterium bovis</i>	1	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>Lactis</i>	1
<i>Enterococcus solitarius</i>	1	<i>Lactococcus garvieae</i>	1
<i>Enterococcus faecium</i>	1		

Os resultados referentes à diversidade de bactérias Gram-positivas mostraram-se de acordo com encontrados na literatura, os quais pressupõem que os psicrotróficos Gram positivos mais comumente isolados de tanques de

refrigeração para leite cru pertencem a espécies dos gêneros *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Corynebacterium*, *Micrococcus* e *Streptococcus* (HOLM et al., 2004; SILVA, 2006).

Silva (2006) analisou a microbiota presente em tanques de expansão para refrigeração de leite cru e encontrou *Enterobacter* spp., *Enterobacter hafnia*, *Pseudomonas* spp., *Streptococcus* spp., *Micrococcus* spp., *Staphylococcus* spp. e *Bacillus* spp.

Holm et al. (2004) encontraram resultados semelhantes aos obtidos neste trabalho. Esses pesquisadores analisaram amostras de tanques de refrigeração por expansão e encontraram bactérias psicotróficas Gram-negativas e Gram-positivas. Entre as bactérias Gram-positivas foram encontradas bactérias corineformes, *Lactococcus* spp., *Micrococcus* spp. e *Staphylococcus* spp. Esses microrganismos estavam presentes em 53% das amostras. *Bacillus* spp., *Enterococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* e leveduras também foram encontrados, porém, em menor proporção (25% das amostras).

Os mesmos gêneros de bactérias psicotróficas Gram-positivas encontradas em tanques de expansão para refrigeração de leite cru também podem ser encontrados no leite armazenado em tanques de resfriamento.

Nörnberg et al. (2010) identificaram *Enterococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus* spp. e *Bacillus* spp. em amostras de leite cru. Diversos autores (BOWER; DAESCHEL, 1999; CHEN et al., 2003; COUSIN, 1982; HAYES; BOOR, 2001; SNARY et al., 2004) afirmam que, entre as bactérias psicotróficas Gram-positivas comumente encontradas em leite, estão representantes dos gêneros *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Corynebacterium*, *Micrococcus* e *Streptococcus*.

Ercoline et al. (2008) analisaram, por meio de técnicas moleculares (RAPD), leite cru refrigerado presente em tanques de expansão. Esses

pesquisadores encontraram, entre os isolados Gram-positivos, *Staphylococcus pasteurii*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus epidermidis*, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus piscium*, *Bacillus thuringiensis*, *Rodococcus erythropolis*, *Corynebacterium variabilis* e *Carnobacterium piscicola*.

Segundo Holm et al. (2004) e outros autores citados por ele (BRAMLEY; MCKINNON, 1990), *Micrococcus* spp., *Staphylococcus* spp. coagulase negativo, *Enterococcus* spp. e bactérias corineformes chegam ao tanque por meio do leite contaminado. A contaminação ocorre devido à higienização inadequada dos tetos do animal, uma vez que esses microrganismos são constantemente encontrados nas superfícies dos tetos.

O número e os tipos de microrganismos presentes em tanques de expansão para refrigeração de leite cru provêm informações sobre as condições higiênicas durante vários passos da produção de leite na fazenda (JAYARAO; WOLFGANG, 2003).

A contaminação do leite presente em tanques de refrigeração tem três principais fontes: animais com mastite, que fornecem leite de baixa qualidade microbiológica, contaminação dos tetos e úbere e da superfície de equipamentos e tanques mal higienizados (ELMOSLEMANY et al., 2010; MURPHY; BOOR, 2000).

A presença de *Bacillus*, *Enterococcus* spp., *Lactococcus* spp., *Micrococcus* spp., bactérias corineformes, coliformes e leveduras pode estar associada com a falta de higiene (BRAMLEY; MCKINNON, 1990; HOLM et al., 2004). A presença de *Bacillus* spp. e *Micrococcus* spp. é associada a leite remanescente presente em borrachas e em equipamentos de ordenha (BRAMLEY; MCKINNON, 1990; HOLM et al., 2004).

Os microrganismos presentes no leite contaminado podem aderir à superfície dos tanques. A presença de leite e água residual nos tanques oferece nutriente e condições para o crescimento e o estabelecimento de uma microbiota

psicotrófica nos tanques de expansão (ELMOSLEMANY et al., 2009; JAYARAO; WOLFGANG, 2003).

As bactérias identificadas neste trabalho foram isoladas das paredes dos tanques de expansão após a higienização. A presença delas após a higienização indica falhas na limpeza dos tanques, as quais permitem que os resíduos aderidos aos equipamentos transformem-se em potencial fonte de contaminação.

A presença de resíduos nos tanques de expansão favorece o crescimento de bactérias e, até mesmo, a formação de biofilmes, nos quais as populações bacterianas encontram-se aderidas a uma superfície e imersas em uma matriz polimérica orgânica. O biofilme confere proteção às bactérias contra ação de detergentes e sanificantes (AKUTSU, 2001; DRENKARD, 2003; OULAHAL et al., 2008). A ocorrência de biofilmes em tanques de refrigeração, tubulações e equipamentos nas indústrias de laticínios representa riscos pré e pós-processamento do leite (AKUTSU, 2001). Bactérias patogênicas provenientes de biofilmes podem contaminar o leite armazenado sob refrigeração. Além disso, elas se multiplicam nos tanques, produzindo enzimas extracelulares que degradam proteínas em peptídeos menores, utilizados para o crescimento bacteriano, o que promove alterações no leite que levam à sua deterioração.

De acordo com Munsch-Alatossava e Alatossava (2006), 88% das bactérias isoladas de leite cru em propriedades na Finlândia foram psicotróficas, as quais apresentaram alta atividade proteolítica e lipolítica.

Os principais gêneros envolvidos na alteração do leite são *Bacillus* spp. e *Pseudomonas* spp., um representante Gram-positivo e outro Gram-negativo, respectivamente (CHEN et al., 2003; MARSHALL ; SCHIMIDT, 1988). Neste trabalho foi averiguada a presença e a predominância de bactérias do gênero *Bacillus* entre os isolados Gram-positivos.

Segundo Fonseca e Santos (2000), *Bacillus* e *Staphylococcus* são capazes de deteriorar o leite. Esses microrganismos também foram isolados e

identificados neste trabalho. A presença de bactérias do gênero *Staphylococcus* e *Bacillus* em tanques de refrigeração desperta o interesse não só pela característica deteriorante, mas também pela possibilidade de ocorrerem espécies patogênicas. Bactérias como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Bacillus subtilis* podem produzir toxinas responsáveis por quadros de gastroenterites em seres humanos (JAY, 2005).

Os resultados deste trabalho mostraram a presença, em maior proporção, de *Bacillus subtilis*. De Jongle et al. (2010) relatam a capacidade dessas bactérias de produzirem substâncias citotóxicas termolábeis, assim como outro tipo de substância citotóxica termoestável diferente da toxina emética. A produção desta toxina tem sido relatada por outros autores (NAKAMURA; ROBERTS; COHAN, 1999). Tal fato ressalta a presença de *B. subtilis*, preocupante tanto do ponto de vista deteriorativo como também patológico.

A maioria dos microrganismos psicrotróficos é destruída pela pasteurização, com exceção das bactérias termodúricas, que são resistentes a tratamentos térmicos comumente utilizados na pasteurização do leite (SVENSSON et al., 2003). Algumas espécies dos gêneros *Bacillus*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Streptococcus* e *Corynebacterium* são psicrotróficos termodúricos, podendo sobreviver à pasteurização e crescer em baixas temperaturas (BOOR, 2001; COUSIN, 1982; GRIFFITHS, 1981; HAYES; SORHAUGH; STEPANIAK, 1997). Nesta pesquisa, foram encontradas bactérias dos gêneros *Micrococcus*, *Corynebacterium* e *Bacillus*. Segundo Stepaniak (2000), Hayes e Boor (2001), estas bactérias têm sido comumente encontradas em leite. Dentre os possíveis psicrotróficos termodúricos encontrados, os *Bacillus* destacaram-se, em termos quantitativos, perfazendo 43% do total de isolados identificados. Phillips e Griffiths (1990), citados por CHEN et al. (2003), observaram que 86% das bactérias psicrotróficas termodúricas isoladas de leite cru eram espécies de *Bacillus*.

A maior percentagem *Bacillus* encontrada neste trabalho pode estar relacionada à sua fisiologia, pois são bactérias formadoras de esporo. O solo contém alta proporção de esporos de psicrotróficos, os quais chegam ao úbere e podem contaminar o leite durante a ordenha (MCKINNON; PETTIPHER, 1981). Os esporos podem aderir à superfície dos tanques, permanecendo por longos períodos (SVENSSON et al., 2003). A contaminação por essas bactérias é considerada um fator crítico que influencia a manutenção da qualidade do leite refrigerado.

Várias espécies de *Bacillus* são capazes de produzir esporos altamente resistentes ao calor. Segundo Sheldeman et al. (2005), alguns bacilos sobrevivem ao tratamento UHT (2-5s, 140-145°C), desempenhando um papel na deterioração do leite, acarretado pelo seu desenvolvimento posterior ao tratamento térmico. A deterioração do leite por espécies de *Bacillus* é proporcionada por suas enzimas proteolíticas e lipolíticas termoestáveis (CHEN et al., 2003).

Além de *Bacillus*, outras espécies de bactérias psicrotróficas apresentam capacidade de produção de enzimas proteolíticas e lipolíticas, muitas delas com elevada termorresistência, as quais mantêm sua atividade após a pasteurização (CARVALHO, 2001).

A presença de *Staphylococcus e Streptococcus* no leite pode indicar a presença de animais doentes no rebanho. Segundo Bizari (2002), 90% das mastites são ocasionadas por bactérias, principalmente *S. aureus* e bactérias do gênero *Streptococcus*. Neste trabalho, foram isoladas bactérias do gênero *Staphylococcus e Corynebacterium*, inclusive *C. bovis*. Estes microrganismos podem ser encontrados em leite proveniente de vacas com mastite (BIZARI, 2002; CRUZ et al., 1994; HONKANEN-BUZALSKI; MYLLYS; KULKAS, 1996).

Enterococcus spp. pode ser comumente encontrado na microbiota do leite cru, segundo Lafarge et al. (2004), que identificaram, por meio de técnicas moleculares, espécies de *Enterococcus* em leite cru e após 48 horas sob refrigeração a 4,4°C. Tebaldi et al. (2008) também isolaram e identificaram este microrganismo em amostras de leite cru em tanques de refrigeração por expansão.

Santana et al. (2004) constataram que os principais pontos de contaminação por psicrotóxicos e microrganismos proteolíticos na cadeia de produção de leite das fazendas estudadas foram atribuídos à limpeza inadequada dos tanques de refrigeração ou à presença de água residual e à sanitização inadequada das tetas das vacas.

A presença de bactérias psicrotóxicas nos tanques de refrigeração e no leite pode ser decorrente de práticas inadequadas de obtenção e pré-beneficiamento do leite, somado ao fato do favorecimento de seu desenvolvimento por armazenamento sob refrigeração (HAYES; BOOR, 2001; MILLOGO et al., 2010; NÖRNBERG et al., 2010; STEPANIAK, 2000).

A capacidade de crescimento de bactérias psicrotóxicas em temperaturas de refrigeração deve-se a alterações promovidas em suas proteínas, enzimas e na membrana celular. Essas bactérias têm taxas metabólicas mais lentas sob baixas temperaturas. No entanto, não cessam seu crescimento (RUSSEL; NICHOLS, 1999; KUMAR et al., 2002).

Baixas temperaturas induzem mudanças na composição dos ácidos graxos presentes na membrana celular das bactérias psicrotóxicas. O aumento do grau de insaturação de ácidos graxos provoca um decréscimo no ponto de fusão. Essa alteração teria a função de manter o estado fluido dos lipídeos, permitindo a permeabilidade e a atividade da membrana plasmática (JAY, 2005; KUMAR et al., 2002; RUSSEL; NICHOLS, 1999).

Além da alteração na insaturação dos ácidos graxos da membrana, bactérias psicrotróficas também expressam proteínas mais resistentes a baixas temperaturas. A expressão de proteínas específicas para combater o choque frio e proteínas aclimatadoras facilita a adaptação dessas bactérias ao ambiente, permitindo seu crescimento e o consequente predomínio da microbiota em tanques de expansão e leite refrigerado (BERGER et al., 1996).

Por proporcionar um excelente meio para o desenvolvimento de microrganismos, a preocupação em preservar a qualidade do leite deve começar mesmo antes da ordenha (BRITO; BRITO, 2002). Deve haver controle da sanidade do rebanho, dos ordenhadores e de todo pessoal envolvido na realização da atividade, na limpeza das instalações de ordenha, na higienização de todos os utensílios, superfícies e equipamentos que entram em contato com o produto e na realização do controle da qualidade bacteriológica da água utilizada nesses procedimentos. A utilização de procedimentos adequados previne a adesão e, até mesmo, a formação de biofilmes microbianos em utensílios e equipamentos como tanques de expansão (BRITO; BRITO, 2002).

3.2 Avaliação da produção de proteases, lipases e lecitinases

Os psicrotróficos Gram-positivos identificados neste trabalho apresentaram potencial para produção de proteases e lipases, evidenciando suas características deterioradoras, verificando-se que 43 (83%) isolados testados produziram proteases e 45 (87%) produziram lipases. A produção de lecitinase foi observada em menor escala, sendo expressa por 33 (63%) isolados.

Os resultados referentes à produção de proteases, lipases e lecitinases pelas bactérias psicrotróficas Gram-positivas identificadas neste trabalho são apresentados na Tabela 2.

De acordo com os dados apresentados na Tabela 2, pode-se observar que todos os isolados de *Lactococcus* e *Micrococcus* produziram proteases. Esta enzima também foi produzida por 91% dos isolados de *Bacillus*, 88% dos isolados de *Enterococcus*, seguidos por 69% de *Corynebacterium* e 66% de *Staphylococcus*.

Quanto à lipase, constatou-se a produção por 93% dos isolados de *Corynebacterium*, seguidos por 91% de *Bacillus*, 77% de *Enterococcus*, 66% de *Staphylococcus* e 50% de *Lactococcus*. O isolado de *Micrococcus sedentarius* também apresentou produção de lipase.

A lecitinase foi expressa por 64% dos isolados. Resultados semelhantes foram obtidos por Munsch-Alatossava e Alatossava (2006) e De Jongle et al. (2010) que relataram que a lecitinase foi produzida em menor escala e por um número menor de isolados, quando comparada à produção de proteases e lipases. Dentre os produtores de lecitinase, destacam-se bactérias do gênero *Bacillus* e *Corynebacterium*. Vinte e dois por cento (22%) dos isolados de *Enterococcus* produziram lecitinase. Isolados de *Lactococcus* e *Micrococcus* não apresentaram produção desta enzima. Girard e Cosenza (1970) obtiveram resultados semelhantes com *Micrococcus* spp., durante sua classificação e caracterização, e constataram que a lecitinase não foi produzida por nenhum isolado de *Micrococcus*.

Tabela 2 Produção de enzimas extracelulares por bactérias Gram-positivas psicrotróficas isoladas da superfície de tanques de refrigeração

Identificação do microrganismo	Número de bactérias isoladas	Número de isolados produtores de enzimas		
		Protease	Lipase	Lecitinase
<i>Bacillus subtilis</i>	20	18	18	16
<i>Bacillus licheniformis</i>	3	3	3	3
<i>Enterococcus faecalis</i>	6	5	5	1
<i>Enterococcus solitarius</i>	1	1	1	1
<i>Enterococcus durans</i>	1	1	0	0
<i>Enterococcus faecium</i>	1	1	1	0
<i>Corynebacterium</i> spp.	9	7	8	8
<i>Corynebacterium jeikeium</i>	3	2	3	2
<i>Corynebacterium bovis</i>	1	0	1	0
<i>Corynebacterium aquaticum</i>	1	0	1	1
<i>Staphylococcus</i> spp.	1	1	1	1
<i>Staphylococcus simulans</i>	1	1	1	0
<i>Staphylococcus vitulus</i>	1	0	0	0
<i>Lactococcus lactis</i>	1	1	1	0
<i>Lactococcus garvieae</i>	1	1	0	0
<i>Micrococcus sedentarius</i>	1	1	1	0

Dentre os isolados identificados neste trabalho, as bactérias do gênero *Bacillus* ocorreram em maior número e apresentaram elevada produção enzimática. Diversos autores (CHEN et al., 2003; STANLEY et al., 2003; SVENSSON et al., 2003) relatam a capacidade de produção de proteases, lipases e lecitinases por essas bactérias. De Jongle et al. (2010) obtiveram resultados semelhantes com diversas espécies de *Bacillus* isolados de leite cru, na Bélgica. Segundo estes autores, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. clausii* e *B. cereus* são bactérias fortemente proteolíticas e lipolíticas.

As espécies de *Bacillus* geralmente sintetizam uma variedade de proteases e lipases, sendo as serinoproteases e as metaloproteases as mais comuns (CHEN et al., 2004). Esses mesmos autores verificaram que 50% das proteases sintetizadas por linhagens de *Bacillus* mantiveram-se ativas, mesmo após a pasteurização.

A grande maioria das proteases sintetizadas por bactérias psicrófilas é de serinoproteases e metaloproteases (CHEN et al., 2003; NÖRNBERG et al. 2010). Estas proteases, especialmente as metaloproteases, são mais estáveis ao calor, persistindo após o tratamento térmico (CHEN et al., 2003).

A presença de enzimas extracelulares, como lipases, proteases e lecitinases, no leite, está diretamente relacionada com a qualidade sensorial e com a deterioração de produtos derivados (MANZANO et al., 2004; NÖRNBERG et al., 2010). As lipases e as proteases, mesmo em baixas concentrações, são capazes de degradar gordura e proteína, causando, respectivamente, sabor de ranço e amargo no leite e em produtos lácteos estocados sob refrigeração (SORHAUG; STEPANIAK, 1997).

Muitos psicrófilos são capazes de produzir enzimas extracelulares termorresistentes, que podem reduzir a qualidade e a vida de prateleira do leite termicamente tratado e de produtos lácteos fabricados com leite contaminado (COUSIN, 1982; FAIRBAIRN; LAW, 1986; NÖRNBERG et al., 2010). Por essa razão, eles são considerados organismos deterioradores.

As proteases desestabilizam a estrutura da micela da caseína e hidrolisam, principalmente, a κ -caseína, convertendo-a em para- κ -caseína, coagulando o leite e formando peptídeos de baixo peso molecular e aminoácidos, os quais podem conferir gosto amargo ao produto. A alfa e a beta caseínas também estão susceptíveis à ação da protease (CROMIE, 1992; FAIRBAIRN; LAW, 1986; SORHAUG; STEPANIAK, 1997).

As lipases atuam na hidrólise dos triglicerídeos do leite, levando à formação de di e monoglicerídeos, com posterior produção de ácidos graxos livres, como ácido butírico, ácido caproico, ácido caprílico e ácido cáprico, que promovem a alteração do sabor. Esse processo provoca rancidez, tornando o alimento impróprio para o consumo (CROMIE, 1992; COUSIN, 1982; PRATA, 2001).

Lecitinase ou fosfolipase é um tipo de enzima capaz de provocar rompimento da membrana do glóbulo de gordura do leite, promovendo a exposição da gordura que, por sua vez, pode ser degradada por lipases do leite, resultando em degradação física e emulsificação do leite (CRAVEN; MAC CAULEY, 1992; SHAH, 1994).

A pasteurização reduz a atividade de fosfolipases, mas não as elimina do leite (KOKA; WEIMER, 2001).

Segundo Priest (1977), Schokker e Vam Boekel (1997), a produção de proteases, lipases e lecitinases acontece durante a fase exponencial e antes da fase estacionária, paralela com o crescimento. Aspectos relacionados à higiene e à adequada manipulação do leite são indispensáveis para conter a contaminação e assegurar a qualidade do leite, que deve estar associada com rígida manutenção da refrigeração a 4°C e minimização do tempo de estocagem do leite cru (SORHAUG; STEPANIAK, 1997).

4 CONCLUSÃO

Bactérias Gram-positivas psicrotólicas isoladas de tanques de refrigeração por expansão são pertencentes aos gêneros *Bacillus* (43%), *Corynebacterium* (26%), *Enterococcus* (17%), *Staphylococcus* (8%), *Lactococcus* (4%) e *Micrococcus* (2%). Foram encontrados isolados de *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Corynebacterium* spp., *Corynebacterium jeikeium*, *Corynebacterium aquaticum*, *Corynebacterium bovis*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*, *Staphylococcus* spp., *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus vitulus*, *Staphylococcus saccharolyticus*, *Lactococcus lactis* ssp *lactis*, *Lactococcus garviae* e *Micrococcus sedentarius*.

A maioria dos isolados de todos os gêneros de bactérias Gram positivas encontradas em tanques de refrigeração produziu proteases e lipases. Protease foi produzida por 83% dos isolados e lipase foi produzida por 87% dos isolados. A produção de lecitinase pelas bactérias encontradas ocorre com menor frequência e *Lactococcus* e *Micrococcus* não a produzem.

REFERÊNCIAS

- AKUTSU, C. K. **Adesão de esporos de *Bacillus sporothermodurans* ao aço inoxidável e sua resistência a sanificantes químicos em condições de uso simulado**. 2001. 82 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2001.
- ALATOSSAVA, P. M.; ALATOSSAVA, T. Phenotypic characterization of raw milk-associated psychrotrophic bacteria. **Microbiological Research**, Copenhagen, v. 161, n. 4, p. 334-346, 2005.
- BERGER-BÄCHI, B. Resistance mechanisms of Gram-positive bacteria. **International Journal of Medical Microbiology**, Würzburg, v. 292, p. 27-35, 2002.
- BIZARI, P. A. **Eficiência da contagem microscópica na avaliação da qualidade progressa da matéria-prima utilizada no processamento de leite UAT (Ultra Alta Temperature)**. 2002. 54 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2002.
- BOWER, C. K.; DAESCHEL, M. A. Resistance responses of microorganisms food environments. **International Journal Food Microbiology**, Amsterdam, v. 50, n. 1/2, p. 33-44, Sept. 1999.
- BRAMLEY, A. J.; MCKINDON, C. H. The microbiology of raw milk. **Dairy Microbiology**, London, v. 1, p. 163-208, 1990.
- 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.
- BRITO, J. R. F.; BRITO, M. A. V. P. Qualidade higiênica do leite. **Revista Clube Valeu Vallée**, São Paulo, n. 10, p. 4-6, 2002.
- BRITO, J. R. F. et al. Adoção de boas práticas agropecuárias em propriedades leiteiras da Região Sudeste do Brasil como um passo para a produção de leite seguro. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 32, n. 2, p. 125-131, 2004.

- CARVALHO, E. P. **Microbiologia de alimentos**. 2001. 128 p. Monografia (Especialização em Processamento e Controle de Qualidade em Carne, Leite, Ovos e Pescado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001.
- CHEN, L. COOLBEAR, T.; DANIEL, R. M. Characteristics of proteases and lipases produced by seven *Bacillus* sp. Isolated from milk powder production lines. **International Dairy Journal**, Barking, v. 14, p. 495-504, 2004.
- CHEN, L.; COOLBEAR, T.; DANIEL, R. M. Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. **International Dairy Journal**, Barking, v. 13, p. 255-275, 2003.
- COUSIN, M. A. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: A review. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 45, n. 2, p. 172-207, Feb. 1982.
- CRAVEN, H. M.; MAC CAULEY, B. J. Microorganisms in pasteurized milk after refrigerated storage, I: identification of types. **Review of Agricultural Economics**, Lexington, v. 47, p. 38-45, 1992.
- CROMIE, S. Psychrotrophs and their enzymes residues in cheese milk. **Australian Journal of Dairy Technology**, Victoria, v. 47, n. 2, p. 96-100, Nov. 1992.
- CRUZ, M. E. et al. Etiology and prevalence of subclinical mastitis in the Manchega sheep at mild-late lactation. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 14, p. 175-180, 1994.
- DE JONGLE, V. et al. Toxigenic and spoilage potential of aerobic spore-formers isolated from raw milk. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 136, p. 318- 325, 2010.
- 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.
- DRENKARD, E. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Review. **Microbial and Infection**, Paris, v. 5, p. 1213-1219, 2003.

- ELMOSLEMANY, A. M. et al. Risk factors for bacteriological quality of bulk tank milk in Prince Edward Island dairy herds. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 92, p. 2644-2652, 2009.
- ELMOSLEMANY, A. M. et al. The association between bulk tank milk analysis for raw milk quality and on-farm management practices. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 95, p. 32-40, 2010.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Estatísticas do leite**. Juiz de Fora, 2007. Disponível em: <Erro! A referência de hiperlink não é válida.>. Acesso em: 12 abr. 2010.
- ERCOLINI, D. et al. Molecular identification of mesophilic and psychrotrophic bacteria from raw cow's Milk. **Food Microbiology**, London, v. 26, p. 228-231, 2009.
- 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.
- FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. **A qualidade do leite e controle da mastite**. São Paulo: Lemos, 2000. 175 p.
- GIRARD, A. E.; COZENZA, B. J. *Micrococcus diversus* sp.nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Iowa, v. 20, n. 2, p. 179-183, Apr. 1970.
- GRIFFITHS, M. W. Thermostability of proteases and lipases of a number of species of psychrotrophic bacteria of dairy origin. **Journal of Applied Bacteriology**, Normay, v. 50, p. 289-303, 1981.
- HAYLES, M. C.; BOOR, K. Raw milk and fluid milk products. In: MUNSCH-ALATOSSAVA, P.; ALATOSSAVA, T. Phenotypic characterization of raw Milk-associated psychrotrophic bacteria. **Microbiological Research**, Copenhagen, v. 161, n. 4, p. 334-346, 2006.
- HOLM, C. et al. Predominant microflora of downgraded Danish bulk tank milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 87, n. 5, p. 1151-1157, May 2004.
- HONKANEN-BUZALSKI, T. V.; MYLLYS, V.; KULKAS, L. Prevalence of bovine mastitis in Filand. **Suon**, Elenail, v. 102, p. 191-197, 1996.

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

JAYARAO, B. M.; WOLFGANG, D. R. A useful tool for improving milk quality and herd udder health. **The Veterinary Clinics - Food Animal Practice**, Washington, v. 19, p. 75-92, 2003.

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

KUMAR, G. S.; JAGANNADHAM, M. V.; RAY, M. V. Low-Temperature-Induced changes in composition and fluidity of lipopolysaccharides in the Antarctic psychrotrophic bacterium *Pseudomonas syringae*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 184, n. 23, p. 6746-6749, 2002.

LAFARGE, V. et al. Raw cow milk bacterial populations shifts attributable to refrigeration. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, n. 9, p. 5644-5650, 2004.

MANZANO, S. et al. 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**, Barking, v. 15, n. 1, p. 79-84, Jan. 2004.

MARSHALL, D. L.; SCHMIDT, R. T. Growth of *Listeria monocytogenes* at 10°C um Milk freincolate with selected pseudomonads. **Journal of food Protection**, Des Moines, v. 51, n.4, p. 227-282, Apr. 1998.

MCKINNON, C. H.; PETTIPHER, G. L. A survey of heat resistant bacteria in milk with particular reference to psychrotrophic spore-forming bacteria. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 50, n. 11, p. 163-170, 1983.

MILLOGO, V. et al. Raw Milk hygiene at farms, processing units and local markets in Burkina Faso. **Food Control**, Vurrey, v. 21, p. 1070-1074, 2010.

MUNSCH-ALATOSSAVA, P.; ALATOSSAVA, T. Antibiotic resistance of raw milk-associated-psychrotrophic bacteria. **Microbiological Research**, Copenhagen, v. 162, p. 115-123, 2007.

- MUNSCH-ALATOSSAVA, P.; ALATOSSAVA, T. Phenotypic characterization of raw Milk-associated psychrotrophic bacteria. **Microbiological Research**, Copenhagen, v. 161, n. 4, p. 334-346, 2006.
- MURPHY, S.C.; BOOR, K.J. Trouble-shooting sources and causes of high bacteria counts in raw milk. **Dairy Food and Environmental Sanitation**, Kent, v. 20, p. 606-611, 2000.
- NAKAMURA, L. K.; ROBERTS, M. S.; COHAN, F. M. Relationship of *Bacillus subtilis* clades associated with strains 168 and W23: a proposal for *Bacillus subtilis* subsp. *Subtilis* subsp. nov. and *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* subsp. nov. **International Journal of systematic Bacteriology**, Ames, v. 49, p. 1211-1215, 1999.
- NÖRNBERG, M. F. B. L. et al. Proteolytic activity among psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk. **International Journal of Dairy Technology**, Amsterdam, v. 63, n. 1, p. 41-46, 2010.
- OULAHAL, N. et al. Quantitative analysis of survival of *Staphylococcus aureus* or *Listeria innocua* on two types of surfaces: polypropylene and stainless steel in contact with three different dairy products. **Food Control**, Vurrey, v. 19, p. 178-185, 2008.
- PHILLIPS, J. D.; GRIFFITHS, M. W. Pasteurized dairy products: the constraints imposed by environmental contamination, 1990. In: CHEN, L.; DANIEL, R. M.; COOLBEAR, T. Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. **International Dairy Journal**, Barking, v. 13, p. 255-275, 2003.
- PRATA, L. F. **Fundamentos de ciência do leite**. São Paulo: UNESP; FUNEP, 2001. 287 p.
- PRIEST, F. G. Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. **Bacteriological Reviews**, Washington, v. 41, n. 3, p. 711-753, 1977.
- RUSSEL, N. J.; NICHOLS, D. S. Polyunsaturated fatty acids in marine bacteria: a dogma rewritten. **Microbiology**, Spencers Wood, v. 145, p. 767-779, 1999.
- SANTANA, E. H. W. et al. Milk contamination in different points of the dairy process: mesophilic, psychrotrophic and proteolytic microorganisms. **Semina: Ciência Agrárias**, Londrina, v. 25, n. 4, p. 349-358, 2004.

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**, Barking, v. 7, p. 265-271, 1997.

SCHELDEMAM, P. et al. Incidence and diversity of potentially highly heat-resistant spore isolated at dairy farms. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 1480-1494, 2005.

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

SILVA, G. A. V. **Avaliação das condições de obtenção do leite e da ação de sanificantes no tanque de expansão em uma propriedade leiteira do município de Candeias/ Bahia- Estudo de caso**. 2006. 86 p. Dissertação (Mestrado em Alimentos, Nutrição e Saúde) - Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2006.

SNARY, E.L. et al. Antimicrobial resistance: a microbial risk assessment perspective. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v. 53, p. 906-917, 2004.

SORHAUG, T.; STEPANIAK, L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: quality aspects. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 8, n. 2, p. 35-41, 1997.

STANLEY, N. R. et al. Identification of catabolite repression as a physiological regulator of biofilm formation by *Bacillus subtilis* using DNA microarrays. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 185, p. 1951-1957, 2003.

STEPANIAK, L. *Yersinae* other than *Pseudomonas* spp. In: ROGINSKI, H.; FUQUAY, J. M.; FOX, P. F. **Encyclopedia of dairy science**. London: Academic, 2000. v. 1, p. 2345-2351.

SVENSSON, B. et al. Characterization of *Bacillus cereus* isolated from milk silo tanks at eight different dairy plants. **International Dairy Journal**, Barking, v. 14, p. 17-27, July 2003.

TEBALDI, V. M. R. et al. Isolamento de coliformes, estafilococos e enterococos de leite cru proveniente de tanques de refrigeração por expansão comunitário: identificação, ação lipolítica e proteolítica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 3, p. 753-760, jul./set. 2008.

CAPÍTULO 3

Perfil de resistência a antibióticos de bactérias psicotróficas Gram-positivas presentes em tanques de refrigeração para leite

1 INTRODUÇÃO

A resistência de bactérias comensais e patogênicas aos antibióticos tem aumentado muito nos últimos anos. Esse fato é observado ao redor do mundo todo e intensificou as discussões sobre o uso prudente de agentes antimicrobianos na agricultura, em fazenda e em hospitais.

A resistência aos antimicrobianos pode ser intrínseca ou adquirida. A resistência intrínseca reflete a adaptação evolutiva da bactéria ao seu ambiente. A resistência adquirida ocorre devido à mutação no gene que codifica o alvo do antibiótico ou advém da aquisição de plasmídeos e transposons que carregam genes de resistência a diversas classes de antibióticos.

A utilização indevida dos agentes antimicrobianos tem imposto forte pressão seletiva que contribui para o aumento de microrganismos multirresistentes aos antibióticos.

Evidências microbiológicas e clínicas mostram que bactérias resistentes ou fatores de resistência podem ser transferidos de animais para humanos por contato direto e via consumo de produtos de origem animal, resultando em infecções difíceis de serem tratadas (ANTHONY; VAN DEN BOGAARD; STOBBERINGH, 2000).

Diante do preocupante quadro de multirresistência bacteriana torna-se necessário o monitoramento do desenvolvimento de resistência em bactérias e adequações na utilização de antibióticos, com a finalidade de se evitar o uso inadequado dos antimicrobianos por diversos setores da sociedade.

O constante aumento da resistência bacteriana a antimicrobianos por bactérias presentes em leite motivou a realização deste trabalho, cujo objetivo foi avaliar o perfil de resistência aos antibióticos de bactérias Gram-positivas presentes em tanques de expansão para refrigeração de leite cru.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Avaliação da resistência a antibióticos

Foram selecionados doze antibióticos, abrangendo diferentes grupos químicos e funcionais, sendo eles conhecidos como: cefepime (CPM) 30µg, rifampicina (RIF) 30µg, cloranfenicol (CLO) 30 µg, vancomicina (VAN) 30µg, tetraciclina (TET) 30µg, gentamicina (GEN) 10µg, oxacilina (OXA) 1µg, penicilina G (PEN) 10 unidades, eritromicina (ERI) 15µg, clindamicina (CLI) 2µg, sulfazotrin (SUT) 25µg e ciprofloxacina (CIP) 5µg. Os multidiscos contendo os antibióticos foram adquiridos da Laborclin (Paraná, Brasil). Os testes de susceptibilidade/resistência aos antibióticos foram determinados pelo método de difusão dos antibióticos em disco (CLSI, 2008). 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 neste trabalho. Índice MAR acima de 0,2 indica multirresistência (HIRSCH et al., 2006; KRUMPERMAN, 1983).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Perfil de resistência a antibióticos

Todos os isolados apresentaram índice de resistência a múltiplos antimicrobianos igual ou superior a 17% ($MAR \geq 0,17$), ou seja, apresentaram múltipla resistência a dois ou mais antibióticos, dos doze testados. O índice MAR médio foi de 42%, ou seja, resistência média a cinco ou mais antibióticos, dos doze testados.

Munsch-Alatossava e Alatossava (2007) determinaram os perfis de resistência a β -lactâmicos e aminoglicosídeos de bactérias psicrotróficas isoladas de leite cru, na Finlândia. Os resultados revelaram que ao menos 60% dos isolados eram multirresistentes. Valeriano (2007) observou que todas as bactérias psicrotróficas Gram-negativas isoladas de tanques de refrigeração para leite no estado de Minas Gerais apresentaram índice MAR superior a 40%, ou seja, resistência a quatro ou mais drogas de dez testadas.

Corynebacterium spp. foi resistente a quatro antibióticos, dos doze testados, que foram: oxacilina, penicilina G, eritromicina e clindamicina. A resistência ao cloranfenicol foi observada em 89% dos isolados; 78% deles foram resistentes a rifampicina e 11% apresentaram resistência intermediária a este antibiótico; 63% dos isolados foram resistentes ao sulfazotrim e 11% apresentaram resistência intermediária; 55% dos isolados foram resistentes ao cefepime e 33% apresentaram resistência intermediária a este antibiótico; 33% dos isolados foram resistentes à vancomicina e à tetraciclina e outros 33% apresentaram resistência intermediária a estes mesmos antibióticos. Todos os isolados foram sensíveis à gentamicina e à ciprofloxacina.

Florentín Aponte (2007) obteve resultados semelhantes aos observados neste trabalho. *Corynebacterium* spp. foi resistente a diversos antimicrobianos.

De acordo com os autores, 69% dos isolados de *Corynebacterium* spp. foram resistentes à penicilina, 47% foram resistentes à tetraciclina e 66% foram resistentes à sulfatrimetoprim. No presente trabalho, foi observado que 63% dos isolados de *Corynebacterium* spp. apresentaram resistência ao sulfazotrim. Este quadro de resistência ao sulfazotrim não é comum para a maioria dos isolados de outras espécies.

O sulfazotrim é um antimicrobiano que contém sulfa e trimetoprim. Ambos atuam de forma sinérgica, impedindo o metabolismo do ácido fólico, resultando em morte da célula bacteriana. A resistência pode ocorrer devido à produção de enzimas alteradas, que atuam na via metabólica da síntese do ácido fólico. A modificação dessas enzimas, como a di-idrofolato redutase alterada, impede a ligação da enzima com o antibiótico, evitando a inibição da síntese do ácido fólico (ARCHER; CLIMO, 1994; JACOB; ARCHER, 1991; TAVARES, 1996).

A gentamicina apresentou bons resultados. Nesta pesquisa, não houve isolados de *Corynebacterium* spp. resistentes à gentamicina. Na pesquisa realizada por Florentín Aponte (2007), apenas 5% dos isolados de *Corynebacterium* spp. apresentaram resistência à gentamicina.

Os dois isolados da espécie *Corynebacterium jeikeium* foram resistentes a cloranfenicol, oxacilina, penicilina G, eritromicina e clindamicina. Além da resistência aos antimicrobianos citados, um isolado apresentou resistência a rifampicina, vancomicina, gentamicina e ao sulfazotrim. Um dos isolados de *Corynebacterium jeikeium* apresentou resistência intermediária a cefepime, rifampicina, vancomicina e a sulfazotrim. Todos os isolados foram sensíveis à ciprofloxacina.

O isolado de *Corynebacterium bovis* apresentou resistência ou resistência intermediária a todos antibióticos testados. A resistência intermediária foi observada para rifampicina, tetraciclina, cloranfenicol e

ciprofloxacina. O isolado de *Corynebacterium aquaticum* apresentou resistência a cinco antibióticos (vancomicina, oxacilina, penicilina G, eritromicina e clindamicina). Este microrganismo apresentou resistência intermediária ao cefepime.

Todos os isolados de *Enterococcus faecalis* foram resistentes à eritromicina e à clindamicina; 83% dos isolados foram resistentes à gentamicina e à vancomicina; 67% foram resistentes ao cefepime; 33% dos isolados foram resistentes à ciprofloxacina, à penicilina G e à tetraciclina; 17% foram resistentes a cloranfenicol, rifampicina e sulfazotrim; 83% dos isolados de *Enterococcus faecalis* apresentaram resistência intermediária à rifampicina e 17% apresentaram resistência intermediária a cefepime, cloranfenicol, vancomicina e sulfazotrim.

Resultados semelhantes com relação à resistência à gentamicina e à sensibilidade ao cloranfenicol foram relatadas por Saraiva et al. (1997), que relataram que 82% dos isolados de *Enterococcus faecalis* foram resistentes à gentamicina. Segundo Saraiva et al. (1997), altas taxas de resistência foram observadas frente a eritromicina, trimetoprim-sulfametoxazol e ciprofloxacina (98%, 83% e 69%, respectivamente). Os pesquisadores observaram maior sensibilidade ao cloranfenicol, com 82% de isolados sensíveis.

O isolado de *Enterococcus faecium* foi resistente a sete antibióticos (cefepime, vancomicina, gentamicina, oxacilina, eritromicina, clindamicina e ciprofloxacina). *Enterococcus durans* apresentou resistência à gentamicina e à oxacilina. Foi observada resistência intermediária à rifampicina, à eritromicina, à clindamicina e à ciprofloxacina.

Altas taxas de resistência à vancomicina foram observadas em *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*. Enterococos resistentes à vancomicina foram originalmente descritos na Europa Ocidental, em 1988. A partir dessa época, começaram a surgir relatos de seu aparecimento em vários

países do mundo (SADER et al., 1994; SARAIVA et al., 1997). A resistência à vancomicina tem sido observada principalmente entre quatro espécies de enterococos: *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. avium* e *E. gallinarum* (JOHNSON et al., 1990; SARAIVA et al., 1997). A base genética para essa resistência já está bem estudada e envolve vários determinantes gênicos encontrados em transposons, dois componentes do sistema regulatório (*vanR* e *vanS*), uma desidrogenase (*vanH*) e uma ligase que condensa D-alanina com o produto do *vanH* para produzir precursores peptidoglicanos (*vanA*) (ELIOPOULOS, 1993; SARAIVA et al., 1997)

Enterococcus solitarius foi resistente ao cefepime e à oxacilina. Resistência intermediária foi observada à ciprofloxacina.

Enterococcus são bactérias comensais que colonizam o trato gastrointestinal de animais e, ocasionalmente, a cavidade bucal e o trato vaginal. É uma bactéria abundante em fezes. *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* têm sido considerado, nos últimos anos, dos maiores patógenos hospitalares multirresistentes responsáveis por infecções clínicas (SHEPARD; GILMORE, 2002).

Klare et al. (2003) e Gould (2008) explicam que é comum a resistência à vancomicina, à ampicilina, à oxacilina e aos aminoglicosídeos por isolados de *Enterococcus*, que também são comumente resistentes aos beta-lactâmicos e glicopeptídeos. De acordo com Tavares (2000), *Enterococcus* podem ser resistentes a cloranfenicol, tetraciclinas, eritromicina e rifampicina, porém, com menor frequência.

A resistência cromossomal a vários antimicrobianos por *Enterococcus* pode ser resultado da sua necessidade de sobreviver e persistir em ambientes altamente competitivos, como o trato gastrointestinal (SHEPARD; GILMORE, 2002).

Os isolados de *Staphylococcus* spp. foram resistentes a cefepime, penicilina G, eritromicina e oxacilina. A resistência aos beta-lactâmicos, principalmente a penicilina, é comum em *Staphylococcus*. Correa (2003) verificou que 77,89% dos isolados de *Staphylococcus* spp. provenientes de leite foram resistentes à penicilina G. Este autor trabalhou com outro beta-lactâmico, a ampicilina, e verificou altos níveis de resistência, sendo 78,94% dos isolados resistentes à ampicilina.

Segundo Eliopoulos (2009), uma alternativa para enfrentar os *Enterococcus* resistentes à vancomicina, os *Staphylococcus* resistentes à meticilina e outras bactérias Gram-positivas resistentes a múltiplos antibióticos, é a utilização de novos antimicrobianos, como daptomicina, linezoide e tigecilina. Segundo este autor, estes dois últimos apresentam bons resultados frente a *Enterococcus faecium* e a *Enterococcus faecalis*, mesmo em baixas concentrações. Bons resultados também foram obtidos com *Staphylococcus*.

Os isolados de *Lactococcus lactis* apresentaram resistência a cinco antibióticos (cefepime, gentamicina, oxacilina, eritromicina e clindamicina). Resistência intermediária foi observada quando o microrganismo foi exposto a rifampicina. O isolado de *Lactococcus garvieae* foi resistente a penicilina G, vancomicina e eritromicina. Este microrganismo apresentou resistência intermediária à rifampicina, à tetraciclina e à eritromicina.

O isolado de *Micrococcus sedentarius* apresentou resistência à eritromicina e à penicilina G.

Todos os isolados de *Bacillus subtilis* foram resistentes à penicilina G e à vancomicina; 93% foram resistentes à clindamicina; 79% foram resistentes à eritromicina; 43% foram resistentes à tetraciclina; 21% foram resistentes à rifampicina; 14% foram resistentes à oxacilina e à cefepime e 7% foram resistentes a cloranfenicol, gentamicina, sulfazotrim e ciprofloxacina. A resistência intermediária foi observada em 64% dos isolados, quando expostos à

rifampicina; 50% dos isolados apresentaram resistência intermediária à tetraciclina; 21% à oxacilina e à eritromicina; 14% apresentaram resistência intermediária à ciprofloxacina e 7% a cefepime, cloranfenicol e a gentamicina.

Os antibióticos que apresentaram os melhores resultados, ou seja, maior número de *Bacillus subtilis* sensíveis, foram sulfazotrim, cloranfenicol, gentamicina e ciprofloxacina.

Poucos trabalhos relacionados à resistência aos antibióticos por isolados de *Bacillus* são encontrados na literatura. Segundo Bernhard, Schrempf e Goebel (1978), a resistência a estreptomicina e à tetraciclina é codificada por genes presentes em plasmídeos de *B. subtilis*. Olki et al. (2005) afirmam que a resistência a diversos antimicrobianos por isolados de *B. subtilis* se deve à aquisição de genes que codificam proteínas transportadoras responsáveis pelo efluxo de antibióticos.

A resistência aos antibióticos primeiramente deve ser vista como um fator necessário para a sobrevivência do microrganismo no ambiente. Um importante mecanismo de defesa para *Bacillus subtilis*, uma bactéria encontrada principalmente no solo, se deve à aquisição de resistência a determinados antibióticos, que são produzidos por outras bactérias presentes no mesmo ambiente (OLKI et al., 2005).

Neste trabalho, foi possível observar que os isolados de *Bacillus* foram resistentes principalmente aos β -lactâmicos, macrolídeos e lincosamidas. A resistência a estas mesmas classes de antibióticos foi observada para a maioria dos isolados, inclusive os isolados de *Corynebacterium* spp., *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis*. Esse fato pode indicar a ocorrência da transferência de genes de resistência a essas classes de antibióticos entre os isolados presentes em tanques de refrigeração para leite cru.

Entre os isolados de *Bacillus licheniformis*, todos apresentaram resistência à rifampicina, à vancomicina, à penicilina G e à clindamicina. Do

total de isolados desta espécie, 67% foram resistentes à eritomicina e 33% apresentaram resistência intermediária à eritromicina e à oxacilina. Todos foram sensíveis frente à cefepime, cloranfenicol, gentamicina, sulfazotrim e ciprofloxacina.

De acordo com os resultados, foi possível observar que as bactérias psicotróficas isoladas dos tanques de refrigeração por expansão apresentaram resistência a diversas classes de antibióticos, indicando a presença de diferentes mecanismos de resistência. Segundo Takeuchi et al. (2005) e Zhao et al. (2003), a resistência mediada por elementos genéticos móveis é muito comum para os β -lactâmicos (penicilina G, oxacilina e cefepime), macrolídeos (eritromicina) e aminoglicosídeos (gentamicina). Isso explicaria os altos índices de resistência a estes antibióticos apresentado pelas bactérias isoladas neste trabalho.

Diversos isolados foram resistentes aos beta-lactâmicos. Munsch-Alatossava e Alatossava (2007) também observaram resistência acentuada aos β -lactâmicos entre as bactérias psicotróficas isoladas de leite cru. A resistência natural a beta-lactâmicos (penicilina G, oxacilina e cefepime) pode ser atribuída à expressão cromossômica ou pode ser mediada por plasmídeos e transposons conjugativos. A aquisição de resistência está relacionada especialmente à presença de plasmídeos que codificam a produção de enzimas inativadoras de penicilinas (β -lactamases). Estas enzimas podem ser induzidas pela exposição à penicilina G e compostos correlatos, todavia, não são ativas contra cefalosporinas e penicilinas resistentes a penicilinase, como cefepime e oxacilina, respectivamente (BERGER-BÄCHI, 2002; JACOBY et al., 1991; KONEMAN, 1997; MCDOUGAL; THORNSBERRY, 1986).

A utilização de penicilinas semissintéticas, como a oxacilina, tem sido mais constante nos últimos anos (MASSIDA; MONTANARI; VARALDO, 1992). O principal mecanismo de resistência a estes β -lactâmicos é por meio da produção de proteínas fixadoras de penicilina alteradas (*protein binding*

penicillin ou PBPs). As PBPs alteradas possuem baixa afinidade por estes antibióticos; elas fazem parte da membrana citoplasmática de microrganismos como estafilococos e atuam como enzimas no processo de síntese da parede celular. Essas proteínas PBPs alteradas constituem os receptores (de baixa afinidade) aos quais as penicilinas se ligam para exercer seu mecanismo de ação (HARTMAN; TOMASZ, 1984; MALOUIN; BRYAN, 1986, BERGER-BÄCHI, 2002).

A resistência à vancomicina é mediada por duas classes de genes: uma contém o *vanA* e outra, o *vanB*. Ambos produzem resistência por alterar o alvo da vancomicina de D-alanina-D-alanina para D-alanina-D-lactato (RICE, 2006).

A resistência à eritromicina, antibiótico do grupo dos macrolídeos, pode ser resultado de mutações cromossômicas ou da aquisição de plasmídeos. O principal mecanismo bioquímico da expressão da resistência consiste em modificações na subunidade 50S do ribossomo bacteriano. Esta modificação causa alterações as quais resultam na incapacidade do antibiótico em se ligar ao seu receptor (JACOBY; ARCHER, 1991; ARCHER; CLIMO, 1994). Prescott (2003) afirma que a resistência à eritromicina mediada por plasmídeos é bastante comum. A resistência aos macrolídeos também pode ser resultado de efluxo ativo da droga antimicrobiana, produzido pela presença do gene *macrolide efflux*, ou *mef*, que codifica a síntese de uma bomba que media o efluxo de forma ativa (CAMPONOVO, 2002).

A resistência à clindamicina (lincosamida) ocorre por modificações no alvo de ligação do ribossomo e efluxo ativo. A modificação no alvo de ligação do ribossomo ocorre devido a aquisição de um gene *erythromycin ribosome methylase*, ou *erm*, que codifica uma enzima que provoca a metilação do resíduo A2058, localizado no domínio conservado da subunidade 50S do ribossomo bacteriano. A metilação altera a conformação do ribossomo que, por sua vez,

diminui a afinidade de macrolídeos e lincosamidas (BERGER-BÄCHI, 2002; CAMPONOVO, 2002; WEISBLUM, 1995).

Munsch-Alatossava e Alatossava (2007) avaliaram a resistência a antibióticos entre bactérias psicrotróficas isoladas de leite cru e observaram que os isolados apresentaram maior susceptibilidade a antibióticos pertencentes às classes dos aminoglicosídeos (gentamicina) e quinolonas (ciprofloxacina). Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com os obtidos pelos pesquisadores citados acima. Grande parte dos isolados, inclusive isolados de *Corynebacterium* spp. e *Bacillus subtilis*, apresentaram susceptibilidade a aminoglicosídeos (gentamicina) e a quinolonas (ciprofloxacina).

Apesar da presença de microrganismos sensíveis a aminoglicosídeos, é importante destacar que parte dos isolados (83% dos *Enterococcus faecalis*) foi resistente a esta classe de antibiótico. Altos níveis de resistência a aminoglicosídeos envolvem modificações químicas das moléculas dos antibióticos por enzimas microbianas (FERRARA, 2006; LECLERCQ; GLUPCZYNSKI; TULKENS, 1999). As três classes de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos são aminoglicosídeo nucleotidiltransferase, aminoglicosídeo acetiltransferase e aminoglicosídeo fosfotransferase (BERGER-BÄCHI, 2002).

Poucos isolados foram resistentes à ciprofloxacina. Entre eles, destacam-se o isolado de *Corynebacterium bovis*, um isolado de *Bacillus subtilis*, 33% dos *Enterococcus faecalis* e os isolados de *Enterococcus faecium*, *Enterococcus solitarius* e *Enterococcus durans*. Os isolados resistentes à ciprofloxacina podem apresentar mutações cromossômicas que conferem resistência a quinolonas. Alguns trabalhos têm esclarecido os mecanismos de resistência das bactérias a essa droga (HAWKEY, 2003; KLUGMAN, 2003), demonstrando que a resistência a quinolonas é cromossômica e surge da difusão de clones de amostras mutantes. No entanto, a resistência também pode ser mediada, em

menor escala, por plasmídeos que codificam Qnr proteínas que protegem o DNA, ligando-se a quinolonas e comprometendo a sua eficácia (NORDMAN; POIREL, 2005). Quando mutações na topoisomerase são combinadas com mutações nos genes que codificam a girase, têm-se como resultado altas taxas de resistências a quinolonas (BERGER-BÄCHI, 2002).

Segundo Mammeri et al. (2005), os plasmídeos que codificam proteínas que conferem resistência a quinolonas também podem carrear outros genes de resistência, os quais podem conferir resistência a cefalosporinas, aminoglicosídeos, cloranfenicol, rifampicina, sulfonamidas e tetraciclina.

A resistência à rifampicina ocorre devido à mutação no gene *rpoB*, que codifica a cadeia beta da RNA polimerase (WILLIAMS et al., 1994; YAMANDA et al., 1985). Aproximadamente 95% dos isolados resistentes à rifampicina têm mutações em uma região que compreende 69 pares de bases do gene *rpoB* correspondente aos códons 511 ao 533 (MIRANDA et al., 2001). A caracterização do gene *rpoB* em *E. coli* demonstrou que a rifampicina interage impedindo a transcrição e que mutações no gene *rpoB* conferem mudança conformacional no sítio de ação do fármaco, caracterizando a resistência (JIN, GROSS, 1988; MILLER; CRAWFORD; SHINNICK, 1994).

Outro antimicrobiano utilizado neste trabalho foi a tetraciclina. Observou-se que parte dos isolados pertencentes aos gêneros *Corynebacterium* spp (33%), *Enterococcus* (33%) e *Bacillus subtilis* (33%) foi resistente à tetraciclina. A resistência antimicrobiana à tetraciclina é mediada, principalmente, por plasmídeos, os quais carregam genes que codificam a produção da proteína Tet, que é responsável pelo transporte deste antibiótico para fora da célula bacteriana (SOUZA, 1998; SPINOSA, 1996).

Os isolados de *Staphylococcus* spp. e *Micrococcus sedentarius* foram sensíveis à tetraciclina. Resultados semelhantes foram obtidos por Cruz et al. (1998) e Brito et al. (2001). A tetraciclina é bastante utilizada nos tratamentos

das mastites e apresentou boa eficiência para estafilococos isolados de casos de mastites, em São Paulo (CRUZ et al. 1998) e em Minas Gerais (BRITO et al., 2001).

Alguns isolados de *Corynebacterium* spp., *Corynebacterium jeikeium*, *Corynebacterium bovis*, *Enterococcus faecalis* e *Bacillus subtilis* foram resistentes ao cloranfenicol. A resistência pode ser adquirida pela transferência do plasmídeo R e é observada em diversos gêneros bacterianos. O principal mecanismo da resistência ao cloranfenicol consiste na sua inativação enzimática por acetilação, propiciada nos microrganismos resistentes pela presença da enzima cloranfenicol-acetiltransferase (TAVARES, 1996).

O sulfazotrim (sulfametrol-trimetoprim) apresentou os melhores resultados. A maior parte dos isolados de *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus*, *Lactococcus latis*, *Lactococcus garvieae* e *Staphylococcus* spp. foi sensível a este antibiótico. As sulfas e o trimetoprim, como o sulfazotrim, apresentam ação sinérgica da sulfa e do trimetoprim, agindo na via metabólica da síntese do ácido fólico impedindo a sua síntese. O ácido fólico é uma coenzima essencial para a síntese de bases purinas, metionina e timina, que permite o crescimento bacteriano (ARCHER; CLIMO, 1994; JACOB; ARCHER, 1991; TAVARES, 1996).

É provável que o índice elevado de resistência aos antibióticos decorra do uso indiscriminado de antibióticos em propriedades rurais (MEDEIROS et al., 2009).

Uma análise mais detalhada dos dados de múltipla resistência aos antibióticos também permitiu inferir sobre a diversidade microbiana nos tanques de refrigeração por expansão.

É possível observar a diversidade nas populações de *Bacillus subtilis* e de *Enterococcus faecalis*, devido às diferenças entre os perfis de resistência apresentados por isolados destas mesmas espécies (Tabela 1 e Tabela 2). Os

isolados de *B. subtilis* apresentaram sensibilidade a todos os demais antibióticos testados, com exceção dos apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 Perfis de resistência de diferentes isolados de *B. subtilis* a antimicrobianos

Amostra	Resistência a diferentes antimicrobianos
572	vancomicina, penicilina G, clindamicina
584	cefepime, vancomicina, tetraciclina, oxacilina, penicilina G, eritromicina, clindamicina
413	vancomicina, penicilina G, eritromicina, clindamicina
368	vancomicina, tetraciclina, penicilina G, eritromicina, clindamicina
925 A	cefepime, rifampicina, vancomicina, tetraciclina, penicilina G, eritromicina, clindamicina

De acordo com os resultados, os antimicrobianos que apresentam melhores resultados frente a *Bacillus subtilis* são a gentamicina, a ciprofloxacina e o sulfazotrim.

A diversidade entre os isolados de *Enterococcus faecalis* pode ser observada na Tabela 2. Os isolados de *Enterococcus faecalis* apresentaram sensibilidade a todos os demais antibióticos testados, com exceção dos apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 Perfis de resistência de diferentes isolados de *Enterococcus faecalis* a antimicrobianos

Amostra	Resistência a diferentes drogas antimicrobianas
430	cefepime, vancomicina, gentamicina, oxacilina, eritromicina, clindamicina
244b	vancomicina, gentamicina, oxacilina, eritromicina, clindamicina, ciprofloxacina
177	Cefepime, rifampicina, vancomicina, gentamicina, oxacilina, penicilina G, eritromicina, clindamicina
471	cefepime, vancomicina, gentamicina, oxacilina, eritromicina, clindamicina, ciprofloxacina

De acordo com os resultados, o antimicrobiano que apresenta melhor resultado frente aos *Enterococcus faecalis* é o sulfazotrim.

A diversidade de isolados presentes nos tanques de refrigeração pode ser crucial na determinação de multirresistência a antibióticos.

Fazendas representam um grande reservatório de bactérias, contendo genes de resistência a antibióticos. Estes genes, muitas vezes, estão presentes em plasmídeos que, por sua vez, podem ser transferidos a outras bactérias presentes no mesmo ambiente (BYWATER et al., 2004; KNOTHE, 1977; MARTINEZ, 2009). Kruse e Sorum (1994) mostraram que a conjugação e a transferência de plasmídeos R é um fenômeno relativo ao ambiente e pode ocorrer entre estirpes bacterianas de origem humana e animal não relacionadas evolutivamente ou ecologicamente, mesmo na ausência de antibióticos (BYWATER et al., 2004; KNOTHE, 1977).

Além da carga e diversidade de bactérias em um ambiente, outro fator importante relacionado à resistência múltipla aos antibióticos é a utilização de antimicrobianos de forma inadequada, com fins profiláticos ou para a promoção de crescimento. O uso inadequado promove uma pressão seletiva que resulta em

aumento da prevalência de resistência em bactérias encontradas em animais (BYWATER et al., 2004; MARTINEZ, 2009; VIVEKANANDHAN et al., 2002).

É importante ressaltar a possibilidade de transferência de patógenos resistentes a humanos, por meio de água ou alimentos contaminados, fato que tem alertado médicos e pesquisadores ao redor do mundo.

Frente aos problemas relativos ao aumento de resistência aos antimicrobianos por bactérias comensais e patogênicas, há necessidade e urgência na adequação do uso de antibióticos, por meio de práticas responsáveis que abordem desde fazendas a hospitais, com a finalidade de controlar a multirresistência que tem aumentado significativamente nos últimos anos (BOWER; DAESCHEL, 1999; FRENCH, 2005).

4 CONCLUSÃO

Os isolados apresentaram quadro de multirresistência, com índice $MAR \geq 0,17$. Os isolados apresentaram resistência a dois ou mais antibióticos, dos doze testados.

REFERÊNCIAS

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

ARCHER, G. L.; CLIMO, M. W. Antimicrobial susceptibility of coagulase negative staphylococci. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, Washington, v. 38, n. 10, p. 2231-2237, 1994.

BERGER-BÄCHI, B. Resistance mechanisms of Gram-positive bacteria. **International Journal of Medical Microbiology**, Würzburg, v. 292, p. 27-35, 2002.

BERNHARD, K.; SCHREMPF, H.; GOEBEL, W. Bacteriocin and antibiotic resistance plasmids in *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 183, n. 2, p. 897-903, 1978.

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

BRITO, J. R. F. et al. Adoção de boas práticas agropecuárias em propriedades leiteiras da Região Sudeste do Brasil como um passo para a produção de leite seguro. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 32, n. 2, p. 125-131, 2004.

BYWATER, R. et al. European survey of antimicrobial susceptibility among zoonotic and comensal bacteria isolated from food-producing animals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v. 54, p. 744-754, 2004.

CAMPONOVO, C. R. Problemas de resistência em *Streptococcus pyogenes*. **Revista Chilena de Infectologia**, Santiago, v. 19, p. 107-110, 2002. Suplemento 2.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**: 18 Informational supplement. 2008. Disponível em: <<http://www.clsi.org/source/orders/free/m100-s20.pdf>>. Acesso em: 15 abr. 2009.

CORREA, I. **Resistência a drogas antimicrobianas de cepas *Staphylococci* coagulase-positiva isolada de leite mastítico bovino.** 2003. 58 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

CRUZ, A. D. et al. Atividade *in vitro* do donofloxacin e de sete drogas antimicrobianas frente a linhagens de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 50, n. 4, p. 369-373, 1998.

ELIOPOULOS, G. M. Increasing problems in the therapy of enterococcal infections. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, Berlin, n.12, p. 409-412, 1993.

ELIOPOULOS, G. M. Microbiology of drugs for treating multiply drug-resistant Gram-positive bacteria. **Journal of Infection**, London, v. 59, n. 1, p. 17-24, 2009.

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.

FLORENTÍN APONTE, C. C. Perfil de resistência *in vitro* a antimicrobianos de cepas causantes de mastitis aisladas de leche cruda bovina em establecimientos de pequeña y mediana producción. **Memórias do Instituto de Investigación de Ciencias de la Salud**, Assunção, Paraguai v. 3, n. 1, p. 19-25, 2007.

FRENCH, G. L. Clinical impact and relevance of antibiotic resistance. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 57, p. 1514-1527, 2005.

GOULD, I. M. The epidemiology of antibiotic resistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 32, p. 2-9, 2008. Supl.

HARTMAN, B. J.; TOMASZ, A. Low affinity penicillin binding protein associated with β -lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 158, n. 2, p. 513-516, 1984.

HAWKEY, P. M. Mechanisms of quinolones action and microbial response. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v. 51, p. 29-35, 2003.

HIRSCH, D. et al. 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. 121-127, 2006.

JACOBY, G. A.; ARCHER, G. A. New mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 324, n. 9, p. 601-612, 1991.

JIN, D. J.; GROSS, C. A. Mapping and sequencing of mutations in the *Escherichia coli rpoB* gene that lead to rifampicin resistance. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 202, p. 45-48, 1988.

JOHNSON, A. et al. Resistance to vancomycin and teicoplanin: a emerging clinical problem. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 34, p. 280-291, 1990.

KLARE, I. et al. Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 88, p. 269-290, 2003.

KLUGMAN, K. P. The role of clonality in the global spread of fluoroquinolone-resistant bacteria. **Clinical Infectious Diseases**, Boston, v. 36, p. 783-785, 2003.

KNOTLE, H. A review of the medical considerations of the use of tylosin and other macrolide antibiotics as additives in animal feeds. **Infection**, Munich, v. 5, p. 183-187, 1977.

KONEMAN, E. W. et al. **Color atlas and textbook of diagnostic microbiology**. 5th ed. Philadelphia: Lippincott, 1997. 1395 p.

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.

KRUSE, H.; SORUM, H. Transfer of multiple drug resistance plasmids between bacteria of diverse origins in natural microenvironments. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, n. 11, p. 4015-4021, 1994.

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

MALOUIN, F.; BRYAN, L. E. Modification of penicillin binding proteins as mechanisms of β -lactam resistance. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, Washington, v. 30, n. 1, p. 1-5, 1986.

MAMMERI, H. et al. 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.

MARTINEZ, J. L. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. **Environmental Pollution**, Barking, v. 157, p. 2893-2902, 2009.

MASSIDA, O.; MONTANARI, M. P.; VARALDO, E. Evidence for a methicillin hydrolysing β -lactamase in *Staphylococcus aureus* strains with borderline susceptibility to this drug. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 92, p. 223-228, 1992.

MCDUGAL, L. K; THORNSBERRY, C. The role of β -lactamase in staphylococcal resistance to penicillinase resistant penicillins and cephalosporins. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 23, n. 5, p. 832-839, 1986.

MEDEIROS, E. S. et al. Perfil de sensibilidade microbiana *in vitro* de linhagens de *Staphylococcus spp.* Isoladas de vacas com mastite subclínica. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 7, p. 569-574, Jul. 2009.

MILLER, L. P.; CRAWFORD, J. T.; SHINNICK, T. M. The *rpoB* gene of *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 38, p. 805-811, 1994.

MIRANDA, S. S. et al. Mutations in the *rpoB* gene of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Brazil and France. **Memorial do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, p. 247-250, 2001.

MUNSCH-ALATOSSAVA, P.; ALATOSSAVA, T. Antibiotic resistance of raw milk-associated-psychrotrophic bacteria. **Microbiological Research**, Copenhagen, v. 162, p. 115-123, 2007.

MUNSCH-ALATOSSAVA, P.; ALATOSSAVA, T. Phenotypic characterization of raw milk-associated psychrotrophic bacteria. **Microbiological Research**, Copenhagen, v. 161, n. 4, p. 334-346, 2006.

NORDMANN, P.; POIREL, L. Emergency of plasmid-mediated resistance to quinolones in *Enterobacteriaceae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v. 56, n. 3, p. 641-648, Sept. 2005.

OHKI, R. et al. Transcriptional termination control of a novel ABC transporter gene involved in antibiotic resistance in *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 187, n. 17, p. 5946-5954, 2005.

PRESCOT, J. F. Quimioterapia antimicrobiana. In: HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. **Microbiologia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p. 27-46.

RICE, L. B. Antimicrobial resistance in Gram-positive bacteria. **The American Journal of Medicine**, Tucson, v. 119, n. 6, p. 11-19, 2006. Supl.

SADER, H. S. et al. Evaluation and characterization of multiresistant *Enterococcus faecium* from twelve U.S. medical centers. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 32, n. 2, p. 840-842, 1994.

SARAIVA, I. H. et al. Avaliação da sensibilidade a antimicrobianos de 87 amostras clínicas de enterococos resistentes à vancomicina. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 43, n. 3, p. 217-222, 1997.

SHEPARD, B. D.; GILMORE, M. S. Antibiotic-resistant enterococci: the mechanisms and dynamics of drug introduction and resistance, **Microbes and Infection**, Paris, v. 4, p. 215-224, 2002.

SOUZA, E. C. Bactérias ultra-resistentes. **Ciência Hoje**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 138, p. 27-35, 1998.

SPINOSA, H. S. Antibióticos: tetraciclina e cloranfenicol. **Farmacologia aplicada a medicina veterinária**. São Paulo: Guanabara Koogan, 1998.

TAKEUCHI, K. et al. 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 do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 33, n. 3, p. 281-301, 2000.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1996. 792 p.

VALERIANO, C. **Identificação e caracterização de bactérias psicrotróficas gram-negativas isoladas de tanques de refrigeração por expansão**. 2007. 41 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

VIVEKANANDHAN, G. et al. 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.

WEISBLUM, B. Erythromycin resistance by ribosome modification. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 39, n. 3, p. 577-85, 1995.

WILLIAMS, L.D. et al. Characterization of rifampin resistance in pathogenic mycobacteria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 38, p. 2380-2386, 1994.

YAMANDA, T. et al. Alteration of ribosomes and RNA polymerase in drug-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 27, p. 921-924, 1985.

ZHAO, S. et al. Antimicrobial-resistant *Salmonella* serovars isolated from imported foods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 84, n. 1, p. 87-92, 2003.