



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

CAIO HENRIQUE TADASHI IWASE

*Bacillus cereus* e ESPOROS DE BACILOS AERÓBIOS MESÓFILOS E TERMÓFILOS  
DETERIORANTES EM LEITE EM PÓ

CAMPINAS

2017

CAIO HENRIQUE TADASHI IWASE

*Bacillus cereus* e ESPOROS DE BACILOS AERÓBIOS MESÓFILOS E TERMÓFILOS  
DETERIORANTES EM LEITE EM PÓ

*Dissertação apresentada à Faculdade de  
Engenharia de Alimentos da  
Universidade Estadual de Campinas  
como parte dos requisitos exigidos para  
a obtenção do título de Mestre em  
Ciência de Alimentos*

*Orientador: Dirce Yorika Kabuki*

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL  
DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO ALUNO  
CAIO HENRIQUE TADASHI IWASE, E ORIENTADO PELA  
PROFA. DRA. DIRCE YORIKA KABUKI

CAMPINAS

2017

**Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s):** CNPq, 134473/2015-9

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos  
Claudia Aparecida Romano - CRB 8/5816

Iw1b Iwase, Caio Henrique Tadashi, 1994-  
*Bacillus cereus* e esporos de bacilos mesófilos e termófilos deteriorantes em leite em pó / Caio Henrique Tadashi Iwase. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Dirce Yorika Kabuki.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. *Bacillus cereus*. 2. *Bacillus sporothermodurans*. 3. *Geobacillus stearothermophilus*. 4. Leite em pó. 5. Reação em cadeia da polimerase. I. Kabuki, Dirce Yorika. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** *Bacillus cereus* and mesophile and thermophile bacilli spores in milk powder

**Palavras-chave em inglês:**

*Bacillus cereus*

*Bacillus sporothermodurans*

*Geobacillus stearothermophilus*

Milk powder

Polymerase chain reaction

**Área de concentração:** Ciência de Alimentos

**Titulação:** Mestre em Ciência de Alimentos

**Banca examinadora:**

Dirce Yorika Kabuki [Orientador]

Clarice Gebara Muraro Serrate Cordeiro Tenório

Nathália Cristina Cirone Silva

**Data de defesa:** 13-09-2017

**Programa de Pós-Graduação:** Ciência de Alimentos

## BANCA EXAMINADORA

---

Profa. Dra. Dirce Yorika Kabuki  
**Orientadora**

---

Profa. Dra. Clarice Gebara Muraro Serrate Cordeiro Tenório  
Universidade Federal de Goiás  
**Titular**

---

Profa. Dra. Nathália Cristina Cirone Silva  
Universidade Estadual de Campinas  
**Titular**

A ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais por me incentivarem durante todo o percurso para a realização do mestrado.

À minha orientadora Profa. Dra. Dirce, pela orientação, ajuda e paciência para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos que fiz no Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Juliana, Taísa, Karen, Murilo, Gabriela, por todos os momentos de diversão.

À Juliana e a Raiza que me acompanharam desde a época da graduação e continuam comigo na FEA. Obrigado por todos esses anos de amizade.

À todos os amigos que fiz nos laboratórios de microbiologia de alimentos da FEA, Anderson, Ana, Arthur, Bia, Bruna, Damares, Larissa, Mari, Ramon, Rafaela, Verônica, durante esses dois anos que proporcionaram vários momentos de diversão também.

À Livia Danielli por aceitar em participar do projeto como aluna de Iniciação Científica e me ajudar na realização das análises.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq – pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao Centro de Controle de Qualidade de Alimentos do Instituto de Tecnologia de Alimentos (CCQA – ITAL) pela doação das cepas de *Bacillus sporothermodurans* e *Geobacillus stearothermophilus* utilizados neste trabalho.

## RESUMO

O leite em pó é produzido para reduzir os custos durante o transporte e utilizado, além do consumo direto, como ingrediente para outros produtos lácteos. Sua qualidade microbiológica está diretamente relacionada à qualidade do leite *in natura*, condições de processamento e contaminação pós-processo. O tratamento térmico utilizado no processamento não é capaz de inativar os esporos bacterianos, principalmente aqueles resistentes às altas temperaturas. *Bacillus cereus* pode ser encontrado em alimentos podendo causar doenças. Os bacilos termófilos e mesófilos não representam um potencial risco à saúde do consumidor, porém indicam falhas nas condições de higiene e das boas práticas de fabricação. O objetivo do trabalho foi avaliar o nível de contaminação de bacilos esporulados aeróbios mesófilos e termófilos em amostras de diferentes marcas de leite em pó comerciais, com foco para identificação de *B. cereus*, *B. sporothermodurans* e *G. stearothermophilus*. Foram analisadas 80 amostras de leite em pó, compreendendo os tipos integral, desnatado e semidesnatado, adquiridos no comércio de Campinas/SP. O isolamento de células vegetativas e esporos de *B. cereus* seguiu-se o método descrito no *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. A contagem de esporos de bacilos mesófilos utilizou-se o meio PCA adicionado de 0,1% de amido e incubado a 35 °C/48h. A contagem de esporos de bacilos termófilos utilizou-se o meio DTA e incubados a 55 °C/48h. E a contagem de esporos de bacilos altamente resistentes ao calor (HHRS) utilizou-se o meio Ágar BHI adicionado de vitamina B12 1mg/L e incubado a 35 °C/48h. A identificação de *G. stearothermophilus* dos isolados de bacilos termófilos e de *B. sporothermodurans* dos isolados de bacilos HHRS foi realizada pela técnica da PCR. A detecção de genes *nheA*, *nheB* e *nheC* codificadores da enterotoxina do complexo Nhe e dos genes *hblA*, *hblC* e *hblD* codificadores do complexo hemolítico Hbl nos isolados de *B. cereus* foi realizada por PCR. As contagens de células vegetativas e de esporos de *B. cereus* variaram de menor que 2,00 a 2,60 log UFC/g e de menor que 2,00 a 3,00 log UFC/g, respectivamente, sendo que todas as amostras estavam de acordo com o padrão da RDC 12/2001 do Ministério da Saúde. A presença de todos os genes foi observada em 36,84% dos isolados de *B. cereus* e a presença dos genes do complexo Nhe e Hbl foram obtidos em 55,26% e 47,37%, respectivamente. Embora as amostras tenham apresentados baixas contagens de *B. cereus*, estes apresentaram potencial patogênico indicando um risco à saúde do consumidor. A contagem de esporos de bacilos mesófilos variou de menor que 1,00 a 3,81 log UFC/g. A contagem de esporos de bacilos termófilos variou de menor que 2,00 a 5,43 log UFC/g. *G. stearothermophilus* foi identificado em 20,00% das amostras e as contagens variaram de 1,34 a 4,30 log UFC/g. A contagem de bacilos HHRS variou de menor que 2,00 a 3,90 log UFC/g. *B. sporothermodurans* foi identificado em apenas uma amostra e a contagem foi de 2,00 log UFC/g. A detecção de altas contagens de bacilos termófilos e mesófilos, indica a necessidade de melhorias nas condições de higiene no processamento de leite em pó pelas indústrias. Além disso, são necessários mais estudos para verificar a participação de outras espécies entre os bacilos esporulados em leite em pó.

Palavras-chave: *Bacillus cereus*, *Bacillus sporothermodurans*, *Geobacillus stearothermophilus*, leite em pó, PCR.

## ABSTRACT

Milk powder is produced for costs reduction during transportation and is used as ingredient for others dairy products and for direct consumption. Milk powder microbiological quality is related to raw milk quality, processing line and post-process contamination. The heat treatment used in milk powder production is not enough for spore-forming bacteria inactivation, mainly high heat temperature resistant bacteria. *Bacillus cereus* is found in foods and can cause disease. Thermophile bacilli like *Geobacillus stearothermophilus* and mesophile like *Bacillus sporothermodurans* do not represent a risk for consumer health, otherwise indicates hygienic conditions of processing plant and good manufacturing practices. The purpose of study was to evaluate contamination level of mesophile and thermophile spore-forming bacilli in different samples of commercial milk powder highlighting for identification of *B. cereus*, *B. sporothermodurans* and *Geobacillus stearothermophilus*. It was analyzed 80 milk powder samples including whole, semi-skimmed and skimmed milk powder acquired from markets at Campinas/SP. For *B. cereus* vegetative cells and spores isolation was used the method described in Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. For mesophile bacilli spores isolation was used PCA medium added with 0.1% potato starch and incubated at 35 °C/48h. For thermophile bacilli spores was used DTA medium and incubated at 55 °C/48h. And for highly heat resistant (HHR) bacilli spores was used BHI medium added with 1mg/L of vitamin B12 and incubated at 35 °C/48h. For identification of *G. stearothermophilus* from thermophile bacilli isolates and *B. sporothermodurans* from HHR bacilli isolates was by Polymerase Chain Reaction (PCR). The detection of *nheA*, *nheB* and *nheC* genes codifying Nhe enterotoxin complex and *hblA*, *hblC* and *hblD* genes codifying Hbl enterotoxin complex in *B. cereus* isolates was by PCR. Vegetative cells and spores counts of *B. cereus* varied from less than 2.00 to 2.60 log cfu/g and less than 2.00 to 3.00 log cfu/g, respectively, and also all counts was within the standard of RDC 12/2001 of Ministry of Health. The presence of all genes was observed in 36.84% of isolates and the presence of Nhe and Hbl complex genes was found in 55.26% and 47.37% of isolates, respectively. Although all samples showed low counting of *B. cereus*, the isolates showed a pathogenic potential indicating a risk to consumer health. Mesophile bacilli spores count varied from less than 1.00 to 3.81 log cfu/g. Thermophile bacilli spores varied from less than 2.00 to 5.43 log cfu/g. *G. stearothermophilus* was identified in 20.00% (16/80) of milk powder samples and the counting varied from 1.34 to 4.30 log cfu/g. HHR bacilli spores count varied less than 2.00 to 3.90 log cfu/g. Among all isolates, *B. sporothermodurans* was identified in just 1 sample and counting was 2.00 log cfu/g. Detection of high counting of thermophile and mesophile bacilli indicates a necessary of improvement on hygienic conditions and process line of milk powder in industries. Besides, more studies are needed to verify the participation of another spore-forming bacilli species in milk powder.

Key-words: *Bacillus cereus*, *Bacillus sporothermodurans*, *Geobacillus stearothermophilus*, milk powder, PCR.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1 - Distribuição das amostras contaminadas com célula vegetativa de <i>B. cereus</i> por tipo de amostra de leite em pó .....</b>	<b>42</b>
<b>Figura 2 - Distribuição das amostras contaminadas com esporo de <i>B. cereus</i> por tipo de amostra de leite em pó.....</b>	<b>42</b>
<b>Figura 3 - Porcentagem de isolados positivos para presença de genes de enterotoxinas</b>	<b>44</b>
<b>Figura 4 – Porcentagem de isolados que apresentaram combinação dos genes de enterotoxinas .....</b>	<b>47</b>
<b>Figura 5 - Distribuição das amostras contaminadas com esporo de bacilo aeróbio mesófilo por tipo de amostra de leite em pó.....</b>	<b>49</b>
<b>Figura 6 - Distribuição das amostras contaminadas com esporo de bacilo aeróbio termófilo por tipo de amostra de leite em pó .....</b>	<b>51</b>
<b>Figura 7 – Eletroforese em gel de isolados de bacilos termófilos de leite em pó comercial para identificação de <i>G. stearothermophilus</i> .....</b>	<b>53</b>
<b>Figura 8 - Distribuição das amostras contaminadas com esporo de bacilo altamente resistente ao calor por tipo de amostra de leite em pó. ....</b>	<b>57</b>
<b>Figura 9 - Eletroforese em gel de isolados de bacilos altamente resistente ao calor de leite em pó comercial para identificação de <i>B. sporothermodurans</i> .....</b>	<b>58</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 - Composição do leite em pó .....</b>	<b>17</b>
<b>Tabela 2 - Classificação filogenética do gênero <i>Bacillus</i> .....</b>	<b>22</b>
<b>Tabela 3 - Quantidade de amostras analisadas por tipo de leite.....</b>	<b>31</b>
<b>Tabela 4 - Quantidade de amostras analisadas por marca.....</b>	<b>31</b>
<b>Tabela 5 - Sequência dos nucleotídeos.....</b>	<b>35</b>
<b>Tabela 6 - Resultado esperado dos testes bioquímicos de <i>B. cereus</i> .....</b>	<b>39</b>
<b>Tabela 7 – Intervalo de contagem de células vegetativas de <i>B. cereus</i> em leite em pó por marca .....</b>	<b>40</b>
<b>Tabela 8 – Intervalo de contagem de esporos de <i>B. cereus</i> em leite em pó por marca.....</b>	<b>40</b>
<b>Tabela 9 - Distribuição de amostras em relação a contagem de <i>B. cereus</i> .....</b>	<b>41</b>
<b>Tabela 10 – Resultado individual dos genes de virulência dos isolados de <i>B. cereus</i> .....</b>	<b>45</b>
<b>Tabela 11 – Intervalo de contagem de esporos de bacilos aeróbios mésofilos em leite em pó.....</b>	<b>48</b>
<b>Tabela 12 – Intervalo de contagem de esporos de bacilos aeróbios termófilos em leite em pó.....</b>	<b>50</b>
<b>Tabela 13 - Relação de isolados de bacilos termófilos positivos para <i>G. stearothermophilus</i> por tipo de amostra de leite em pó.....</b>	<b>54</b>
<b>Tabela 14 - Contagem de <i>G. stearothermophilus</i> por tipo de amostra de leite em pó.....</b>	<b>55</b>
<b>Tabela 15 – Intervalo de contagem de esporos de bacilos formadores de esporos de alta resistência ao calor em leite em pó.....</b>	<b>57</b>

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	12
2	OBJETIVOS .....	14
2.1	Objetivo Geral .....	14
2.2	Objetivos Específicos .....	14
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	15
3.1	Microbiota do leite cru .....	15
3.2	Leite em pó .....	16
3.2.1	Definições e características .....	16
3.2.2	Processamento do leite em pó .....	17
3.2.3	Legislação de qualidade .....	18
3.3	Micro-organismos formadores de esporos em leite em pó .....	19
3.3.1	Características do gênero <i>Bacillus</i> .....	21
3.3.2	Características de <i>Geobacillus stearothermophilus</i> .....	27
3.4	Métodos moleculares .....	28
4	MATERIAL E MÉTODOS .....	31
4.1	Coleta de amostras .....	31
4.2	Contagem e identificação de células vegetativas e esporos de <i>B. cereus</i> .....	32
4.3	Detecção de genes codificadores de enterotoxinas Nhe e Hbl de <i>B. cereus</i> .....	32
4.3.1	Extração de DNA dos isolados de <i>B. cereus</i> .....	32
4.3.2	Amplificação dos genes codificadores de enterotoxinas .....	33
4.4	Contagem da população de esporos de bactérias aeróbias mesófilas .....	36
4.5	Contagem da população de esporos de bactérias aeróbias termófilas .....	36
4.6	Contagem de esporos de bacilos de alta resistência ao calor .....	36
4.7	Identificação dos isolados de bacilos aeróbios termófilos e bacilos altamente resistente ao calor por PCR .....	37
4.7.1	Extração de DNA dos isolados .....	37
4.7.2	Identificação de <i>Geobacillus stearothermophilus</i> .....	37
4.7.3	Identificação de <i>Bacillus sporothermodurans</i> .....	38
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	39
5.1	Contagem de células vegetativas e esporos de <i>Bacillus cereus</i> .....	39
5.2	Detecção de genes de virulência de <i>Bacillus cereus</i> .....	43
5.3	Contagem de esporos de bacilos mesófilos aeróbios .....	47

5.4	Contagem de esporos de bacilos termófilos aeróbios .....	50
5.4.1	Identificação de <i>Geobacillus stearothermophilus</i> .....	52
5.5	Contagem de esporos de bacilos de alta resistência ao calor .....	56
5.5.1	Identificação de <i>Bacillus sporothermodurans</i> .....	58
6	CONCLUSÕES .....	60
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
8	APÊNDICES .....	74

## 1 INTRODUÇÃO

O leite é um alimento de espécie-específica com objetivo de atender às necessidades nutricionais dos mamíferos, além de desempenhar papéis funcionais no desenvolvimento da prole. Isso se deve a presença de diversas moléculas ativas, incluindo açúcares, nucleotídeos, lipídeos, imunoglobulinas, antimicrobianos, citocinas e outros fatores imunomoduladores (ADDIS et al., 2016).

A produção de produtos lácteos de baixa atividade de água tem o propósito de reduzir os custos durante o transporte, pela relação na redução de peso e volume do produto. Por causa da concentração dos sólidos do leite, esses produtos são utilizados como ingredientes para outros alimentos, por exemplo, sorvetes, doces e produtos de confeitaria (ROBINSON; ITSARANUWAT, 2002).

A qualidade microbiológica do leite em pó está diretamente relacionada a qualidade do leite *in natura*, a linha de processamento e a provável contaminação pós-processo (SKANDERBY et al., 2009). Grande parte das bactérias, incluindo aquelas associadas aos surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) relacionados ao leite em pó, tem origem na contaminação pós-pasteurização. Entretanto, em alguns casos os micro-organismos estão no leite cru e se espalham pela planta de processamento durante a sua produção (FERNANDES, 2009).

*Bacillus cereus* é uma bactéria amplamente distribuída no ambiente pela sua capacidade de resistir a ambientes hostis por causa da sua habilidade de formar esporos resistentes ao calor, sendo capaz de sobreviver em alimentos secos mesmo após o tratamento térmico. É um contaminante comum em alimentos, pode ser encontrado tanto em alimentos crus (arroz, carnes, vegetais e leite) como em alimentos processados, incluindo os produtos lácteos. Está associado à deterioração de alimentos e também é causador de doenças (HWANG; PARK, 2015; ORGANJI et al., 2015).

Os processos térmicos que utilizam altas temperaturas são comumente empregados nas indústrias de alimentos para garantir a estabilidade do produto por longos períodos em temperatura ambiente (PREVOST; ANDRE; REMIZE, 2010). Entretanto, esses tratamentos térmicos não são suficientes para inativar todos os micro-organismos formadores de esporos, principalmente aqueles resistentes às altas temperaturas (HORNSTRA et al., 2009).

A contaminação durante o processamento do leite em pó pode ocorrer na etapa de concentração do leite, antes da secagem em *spray-dryer*, que ocorre em temperatura na faixa

de 45-55 °C. Nessas condições, algumas bactérias termorresistentes podem sobreviver, além de promover o crescimento de algumas bactérias termófilas. Espécies de bactérias termófilas formadoras de esporos, como do gênero *Bacillus* e *Clostridium*, podem ser encontradas em leite em pó (KARAMAN; ALVAREZ, 2015).

Dentre os micro-organismos deteriorantes encontrados em leite em pó, podemos destacar o *Geobacillus stearothermophilus* e *Bacillus sporothermodurans*.

*B. sporothermodurans* é capaz de produzir esporos altamente resistentes ao calor (HHRS – *Highly Heat-Resistant Spore*) e foi primeiramente isolado a partir de leite UHT (*Ultra High Temperature*) (HAMMER et al., 1995; PETTERSSON et al., 1996) e algumas cepas são capazes de resistir a temperaturas acima de 135 °C. É um micro-organismo ubíquo, podendo ser encontrado em diversos ambientes, sendo assim difícil de impedir a sua presença em alimentos crus ou ingredientes (SCHEDELMAN et al., 2006).

*G. stearothermophilus* é um micro-organismo termófilo importante no setor industrial como fonte de enzimas com alta estabilidade térmica, indicador biológico de esterilidade e principal causador de deterioração em alimentos (DURAND et al., 2015).

Embora os bacilos termófilos não representem um potencial risco à saúde do consumidor, são utilizados como indicadores de higiene da planta de processamento e das boas práticas de fabricação (RÜCKERT et al., 2004).

Diante dos poucos trabalhos sobre micro-organismos esporulados aeróbios em leite em pó, o presente estudo pretende contribuir para esclarecer qual a participação das espécies *G. stearothermophilus*, como representante termófilo e *B. sporothermodurans* como mesófilo, na composição dos deteriorantes esporulados em leite em pó.

Outra justificativa importante para esse estudo é que o Brasil não é autossuficiente na produção de leite em pó, sendo necessário a sua importação (CANAL RURAL, 2016). Desse modo, uma Instrução Normativa foi promulgada recentemente pelo período de 1 (um) ano, IN 40 de 20 de outubro de 2016 regulado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA; BRASIL, 2016), em que o leite em pó produzido nacionalmente pode ser reconstituído para a produção de leite UHT e leite pasteurizado pelas indústrias processadoras que possuem cadastro no Serviço de Inspeção Federal (SIF).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

✓ Avaliar o nível de contaminação de esporos de bacilos aeróbios mesófilos e termófilos em amostras de diferentes marcas de leite em pó comerciais.

### 2.2 Objetivos Específicos

✓ Quantificar células vegetativas e esporos de *Bacillus cereus* em amostras de leite em pó comerciais.

✓ Avaliar o nível de contaminação de esporos de bacilos aeróbios mesófilos e termófilos de amostras de leite em pó comerciais.

✓ Quantificar os esporos de *Geobacillus stearothermophilus* de amostras de leite em pó comerciais.

✓ Quantificar os esporos de *Bacillus sporothermodurans* de amostras de leite em pó comerciais.

✓ Identificar as espécies *Bacillus sporothermodurans* e *Geobacillus stearothermophilus* pela técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

✓ Detectar a presença de gene de virulência da doença diarreica em *B. cereus* isolados das amostras de leite em pó comerciais.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Microbiota do leite cru

O leite é um alimento que possui elevada atividade de água ( $a_w$ ), pH próximo ao neutro e composição de nutrientes, que facilitam o crescimento de diversos micro-organismos (MOATSOU; MOSCHOPOULOU, 2015).

O leite produzido nas glândulas mamárias de animais saudáveis é inicialmente estéril, porém é contaminado durante a ordenha pelo contato com o úbere ou pela mastite. Podem ser encontrados frequentemente no leite recém-ordenhado, cocos Gram positivos, como os estreptococos, estafilococos, micrococos, bactérias ácido-láticas, além de *Pseudomonas* spp. e leveduras (FERNANDES, 2009).

Os equipamentos de ordenha e os tanques de estocagem podem contribuir significativamente com a microbiota psicotrófica do leite cru quando não higienizados corretamente (McKINNON et al., 1990). Essa microbiota pode ser composta pelos gêneros *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Enterobacter*, *Cronobacter*, *Klebsiella*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Achromobacter* e *Alcaligenes*, e também por bactérias Gram positivas como *Corynebacterium*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Bacillus* e *Clostridium* (BOOR; FROMM, 2006). Esses micro-organismos estão relacionados à deterioração do leite quando armazenado em temperatura de refrigeração (MOATSOU; MOSCHOPOULOU, 2015).

Dentre os micro-organismos já citados, algumas espécies são termodúricas, ou seja, podem resistir a altas temperaturas. No caso, quando o leite é submetido ao processo de pasteurização, esses micro-organismos podem sobreviver e deteriorar seus subprodutos. Dentre esses gêneros podemos citar *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* e os esporos de *Bacillus* e *Clostridium* (WALSTRA et al., 2006).

Em relação às bactérias que produzem endósporos, as espécies mais encontradas no leite cru são *Paenibacillus lactis*, *B. cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *B. sporothermodurans* e *G. stearothermophilus* (MOATSOU; MOSCHOPOULOU, 2015).

A presença de esporos de *B. cereus* no leite cru pode estar relacionada ao período de pastejo, quando há o risco dos tetos da vaca serem contaminados pelo solo. Além disso, as possíveis fontes de contaminação também são as fezes, cama, ração e equipamentos de ordenha (MAGNUSSON et al., 2007).

Alguns estudos apoiam a hipótese de que os micro-organismos encontrados no leite não estão relacionados à contaminação externa. As bactérias isoladas das glândulas mamárias são genotipicamente diferentes dos que são isoladas da pele do mesmo hospedeiro (ADDIS et al., 2016). Um estudo realizado por Young et al. (2015) descreveram a existência de um caminho entero-mamário, sendo que alguns micro-organismos possuem a habilidade de deixar o intestino e viajar através do sistema linfático mesentérico alcançando a glândula mamária, porém não há um consenso entre os demais pesquisadores.

Em outro estudo, realizado por Christiansson et al. (1999), foi verificado que o leite cru estava contaminado com esporos de *B. cereus* e que a principal fonte desses esporos foi o solo. O modo de contaminação foi por meio da contaminação indireta do úbere e das glândulas mamárias pelo solo, e o nível dessa contaminação variava entre 2,48 a 5,15 log UFC/mL.

## **3.2 Leite em pó**

### **3.2.1 Definições e características**

De acordo com o CODEX ALIMENTARIUS (FAO/WHO, 2016), o leite em pó é descrito como produto lácteo obtido a partir da remoção parcial da água do leite. O conteúdo de gordura e/ou proteína do leite podem ser ajustados, somente para complementar os requerimentos de composição de acordo com esse código, pela adição e/ou remoção de constituintes do leite desde que não haja a alteração da razão de caseína e proteínas do soro.

Já segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA (BRASIL, 2017), o leite em pó é um produto obtido por meio da desidratação do leite integral, desnatado ou parcialmente desnatado e apto para alimentação humana, mediante processos tecnologicamente adequados.

O leite cuja a água tenha sido removida quase completamente é denominado de leite seco ou leite em pó (MODI, 2009). O leite desidratado possui uma vida de prateleira maior em relação aos leites pasteurizados e refrigerados (KARAMAN; ALVAREZ, 2015). É encontrado comercialmente como leite em pó integral, semidesnatado e desnatado e utilizado como ingrediente para produção de produtos lácteos, produtos de confeitaria, fórmulas infantis e outros alimentos manufaturados, tendo função de fornecer os componentes do leite, como proteínas, gordura e lactose (DEEB et al., 2010; KARAMAN; ALVAREZ, 2015).

A composição do leite em pó, segundo o CODEX ALIMENTARIUS (FAO/WHO, 2016) deve estar de acordo com a composição apresentada na Tabela 1.

**Tabela 1 - Composição do leite em pó**

<b>Leite em pó integral</b>	
Gordura	Mínimo de 26 % e menor que 42 %
Umidade máxima	5 %
Proteína mínima nos sólidos não-gordurosos do leite	34 %
<b>Leite em pó semidesnatado</b>	
Gordura	Maior que 1,5 % e menor que 26 %
Umidade máxima	5 %
Proteína mínima nos sólidos não-gordurosos do leite	34 %
<b>Leite em pó desnatado</b>	
Gordura máximo	1,5 %
Umidade máxima	5 %
Proteína mínima nos sólidos não-gordurosos do leite	34 %

Fonte: CODEX ALIMENTARIUS (FAO/WHO, 2016)

### 3.2.2 Processamento do leite em pó

O processamento do leite em pó consiste nas etapas de recebimento, resfriamento, padronização, aquecimento, concentração, secagem e embalagem. Ao receber o leite cru, esse deve ser armazenado sob refrigeração entre 3 e 5 °C e ser submetido à alguns testes de controle de qualidade da matéria-prima para verificar se o produto está seguro e atende às especificações técnicas de composição química, pureza e níveis de micro-organismos (TESSEMA; TIBBO, 2009).

A primeira etapa do processamento é a padronização do leite, onde o leite é preaquecido a 45 °C e centrifugado para separar a gordura com base na diferença de densidade. Essa gordura é, então, recolocada no leite na quantidade desejada na etapa da padronização (FERNANDES, 2009).

Na etapa de aquecimento, o leite é pasteurizado a temperatura 72-75 °C por 15-20 segundos, sendo que a maioria dos patógenos e deteriorantes é destruída, sobrevivendo apenas os micro-organismos resistentes ao calor (SKANDERBY et al., 2009). Em seguida, o leite pasteurizado é concentrado até alcançar 50% dos sólidos totais (FERNANDES, 2009).

A concentração é importante para facilitar a etapa de secagem e para economizar energia. Pode ser feita em evaporadores operados sob condições de vácuo para evitar a

desnaturação das proteínas do soro, em evaporadores de filme descendente que consistem em trocadores de calor montados verticalmente, onde o líquido e o vapor formado se separam por força centrífuga, ou a concentração pode ser realizada em filtradores por membrana semipermeável, onde a separação ocorre por permeabilidade seletiva, no qual as partículas são separadas de acordo com o seu tamanho (CARIC et al., 2009). Essa concentração térmica também pode contribuir para a melhora da qualidade microbiológica do leite em pó, devido à aplicação de calor em temperaturas entre 140 e 150 °C (ROWE; DONAGHY, 2011).

Na etapa de secagem, o leite pode sofrer dois diferentes processamentos: com rolos ou *spray-dryer*. No processamento com rolos, dois grandes rolos aquecidos internamente giram paralelamente em sentidos opostos com velocidade regulada. Durante a rotação, o leite fluido seca na superfície do rolo. Então, uma faca estacionária remove a fina camada de pó formado na superfície do rolo, e essa passa por um moinho de martelo para transformar em partículas finas uniformes, seguindo posteriormente para embalagem. Entretanto, esse método de secagem é o menos empregado atualmente pelas indústrias (FERNANDES, 2009).

No processamento com *spray-dryer*, o leite pode sofrer dois tratamentos: em secadores com jato ou bico e em atomizadores rotatórios. No primeiro tratamento, o leite é bombeado por alta pressão e aspergido por jatos ou bicos em uma câmara de secagem, e com impacto do ar quente, o leite em pequenas gotas se torna pó (MODI, 2009). No segundo tratamento, o leite é jorrado através de orifícios situados na periferia de um disco circular fixo por um eixo rotativo, para a câmara de secagem com temperatura de 180-220 °C. Por fim, o pó é retirado, resfriado e embalado (FERNANDES, 2009; MODI, 2009).

### **3.2.3 Legislação de qualidade**

De acordo com a legislação atual vigente, a Resolução RDC n° 12 de 02 de janeiro de 2001 regulado pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) do Ministério da Saúde (BRASIL, 2001), estabelece que no leite em pó é permitido uma contagem máxima de  $5 \times 10^3$  UFC/g para *B. cereus*, 10 UFC/g para coliformes a 45 °C,  $10^2$  UFC/g para estafilococos coagulase positiva e ausência de *Salmonella* em 25g para amostragem indicativa.

Segundo a Portaria n° 369 de 04 de setembro de 1997 regulado pelo MAPA (BRASIL, 1997) no Anexo XI do Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite em Pó estabelece um plano de amostragem de 5 amostras (n=5), sendo que 2 amostras (c=2)

podem estar entre o intervalo de  $3,0 \times 10^4$  (m) a  $1,0 \times 10^5$  (M) UFC/g para micro-organismos aeróbicos mesófilos estáveis.

Porém não há um regulamento técnico sobre a qualidade do leite em pó em relação aos bacilos termófilos.

### 3.3 Micro-organismos formadores de esporos em leite em pó

Os principais micro-organismos isolados de produtos lácteos desidratados, como o leite em pó, incluem-se *Anoxybacillus flavithermus*, *Geobacillus* sp., *Paenibacillus* sp., assim como do gênero *Bacillus*, que estão incluídas as espécies *B. licheniformis*, *B. coagulans*, *B. pumilus*, *B. sporothermodurans* e *B. subtilis* (CRIELLY et al., 1994; FLINT et al., 2001; RONIMUS et al., 2003; SCHELDEMAN et al., 2005; SCOTT et al., 2007), pois esses micro-organismos estão amplamente disseminados no ambiente de fazendas e indústrias lácteas (SCOTT et al., 2007; WATTERSON et al., 2014).

Os esporos são estruturas extremamente resistentes às condições de estresse ambiental, como altas temperaturas, baixo pH, baixa  $a_w$ , radiação UV, ação enzimática e ácidos orgânicos. Diante dessas condições letais, os esporos demonstram a capacidade de sobreviver durante a produção do leite em pó (REYES, 2008; BURGESS et al., 2010).

A contaminação do leite por esporos pode ocorrer nas fazendas uma vez que estão disseminadas na natureza, sendo as possíveis fontes a presença de sujidades nas glândulas mamárias da vaca, equipamentos e utensílios utilizados durante a ordenha e as condições do ambiente (VAEREWIJK et al., 2001). Também pode ocorrer a contaminação na indústria durante o processamento (VAN HEDDEGHEM; VLAEMYNCK, 1993).

Os bacilos aeróbios termófilos possuem uma ampla distribuição geográfica e têm a capacidade de produzir esporos resistentes às altas temperaturas. A presença desses micro-organismos nos alimentos pode indicar a contaminação na pré ou pós-pasteurização (RONIMUS et al., 2003). Além disso, essas bactérias podem produzir enzimas termorresistentes, como proteases e lipases, e causar a deterioração do produto (CHEN et al., 2003; LÜCKING et al., 2013).

Os bacilos termófilos são os potenciais contaminantes nas indústrias de alimentos que utilizam elevadas temperaturas (40-70 °C) durante o processo ou armazenamento, como no caso de produtos lácteos desidratados (BURGESS et al., 2010). Embora não tenha relatos desses micro-organismos associados a algum problema de saúde, podem representar como bons indicadores das condições de higiene do processamento do produto, devido à habilidade

de formarem biofilmes bacterianos. Além disso, são potenciais micro-organismos deteriorantes capazes de produzir enzimas e ácidos que podem conferir “off-flavours” no produto final (STADHOUDERS et al., 1982; BURGESS et al., 2010).

*G. stearothermophilus* é o principal bacilo termófilo encontrado em leite em pó, representando até 65% dos isolados, e seus esporos são capazes de sobreviver às altas temperaturas durante o processo de secagem do produto e em condições de baixa atividade de água durante estocagem do produto final por longos períodos (KOTZEKIDOU, 2014).

Estudar esses micro-organismos para avaliar o nível de contaminação quanto às espécies pode fornecer informações importantes para melhorar a qualidade na produção dos produtos lácteos desidratados, ajudando na implementação de medidas preventivas e corretivas, principalmente nas etapas antes do tratamento térmico (YUAN et al., 2012; PENNACCHIA et al., 2014).

Essas bactérias se encontram em baixa quantidade no leite cru, mas podem atingir números relativamente altos em leite em pó, devido à transferência de células presentes em biofilmes formados nas superfícies dos evaporadores (MURPHY et al., 1999; FLINT et al., 2001).

*G. stearothermophilus* e *Anoxybacillus flavithermus* apresentam uma rápida taxa de crescimento e possuem a capacidade de formar biofilmes em aço inoxidável utilizados nos equipamentos de processos (SCOTT et al., 2007).

Embora a maior parte dos bacilos isolados seja deteriorante, há relatos de alguns pesquisadores que encontraram bacilos que podem produzir toxinas, além do *B. cereus*, como *Bacillus licheniformis* (SALKINOJA-SALONEN et al., 1999), *Bacillus circulans*, *Bacillus mycoides* (BEATTIE; WILLIAMS, 1999), *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus* e *Bacillus megaterium* (YOO et al., 2014).

Yuan et al. (2012) analisaram amostras de leite em pó e fórmula infantil e conseguiram isolar bacilos termófilos com maior prevalência de *B. licheniformis*, *A. flavithermus* e *G. stearothermophilus*. Também houve o isolamento de *B. subtilis*. As contagens de bacilos termófilos totais e esporos variaram de  $5,5 \times 10^1$  a  $4,4 \times 10^4$  UFC/g nessas amostras. Os autores também avaliaram a resistência térmica dos esporos dos isolados e foi verificado que uma cepa de *B. licheniformis* e uma de *G. stearothermophilus* conseguiram se multiplicar nos tratamentos de 85 °C/1min e 93 °C/3min. Além disso, foi observada uma pequena redução na contagem de outras cepas isoladas.

Para melhorar o controle do crescimento desses micro-organismos durante o processamento do leite em pó é importante diminuir o tempo de processamento, aumentar a

frequência de higienização e reduzir a área de ponto morto onde pode ocorrer o crescimento de micro-organismos (BURGESS et al., 2010).

### 3.3.1 Características do gênero *Bacillus*

Nos últimos 20 anos, o gênero *Bacillus* sofreu grandes mudanças por causa da taxonomia molecular, e novos gêneros e famílias foram criados (JENSON, 2014).

As bactérias do gênero *Bacillus* apresentam características de bastonetes Gram positivo, formadores de esporos e aeróbios ou anaeróbios facultativos, o que os diferenciam do gênero *Clostridium* que são estritamente anaeróbios. A maioria das espécies de *Bacillus* é mesófila, porém existem espécies termófilas e psicrotróficas. Possuem motilidade pela presença de flagelos peritríqueos, porém algumas espécies são imóveis. As características da colônia, como morfologia e tamanho, variam entre as espécies. Algumas cepas são tolerantes ao sal, enquanto outras são halofílicas. A maioria é catalase positiva, e oxidase positiva ou negativa. Podem ser isolados de diferentes ambientes, como solo, vegetação, fezes, água e ar (VAEREWIJK et al., 2001; JAY, 2005; LOGAN; DE VOS, 2009).

As espécies de *Bacillus* são divididas filogeneticamente em 11 subgrupos, e algumas espécies foram reclassificadas em outros 3 grupos: *Anoxybacillus*, *Geobacillus* e *Saccharococcus*. Esses 11 subgrupos estão classificados conforme a Tabela 2. O gênero *Bacillus* inclui 142 espécies conhecidas.

**Tabela 2 - Classificação filogenética do gênero *Bacillus***

<b>Grupos</b>	<b>Espécies</b>
a	<i>B. subtilis</i> , <i>B. amyloliquefaciens</i> , <i>B. atrophaeus</i> , <i>B. mojavensis</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. sonorensis</i> , <i>B. vallismortis</i> e também a espécie classificada erroneamente <i>Paenibacillus popilliae</i>
b	<i>B. farraginis</i> , <i>B. fordii</i> , <i>B. fortis</i> , <i>B. lentus</i> , <i>B. galactosidilyticus</i>
c	<i>B. asahii</i> , <i>B. bataviensis</i> , <i>B. benzoevorans</i> , <i>B. circulans</i> , <i>B. cohnii</i> , <i>B. firmus</i> , <i>B. flexus</i> , <i>B. fumarioli</i> , <i>B. infernus</i> , <i>B. jeotgali</i> , <i>B. luciferensis</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>B. methanolicus</i> , <i>B. niacini</i> , <i>B. novalis</i> , <i>B. psychrosaccharolyticus</i> , <i>B. simplex</i> , <i>B. soli</i> , <i>B. vireti</i>
d	<i>B. cereus</i> , <i>B. anthracis</i> , <i>B. mycoides</i> , <i>B. thuringiensis</i> , <i>B. weihenstephanensis</i>
e	<i>B. aquimaris</i> , <i>B. marisflavi</i>
f	<i>B. badius</i> , <i>B. coagulans</i> , <i>B. thermoamylovorans</i> , <i>B. acidicola</i> , <i>B. oleronius</i> , <i>B. sporothermodurans</i>
g	<i>B. alcalophilus</i> , <i>B. arsenicoselenatis</i> , <i>B. clausii</i> , <i>B. gibsonii</i> , <i>B. halodurans</i> , <i>B. horikoshii</i> , <i>B. krulwichiae</i> , <i>B. okhensis</i> , <i>B. okuhidensis</i> , <i>B. pseudoalcaliphilus</i> , <i>B. pseudofirmus</i>
h	<i>B. arsenicus</i> , <i>B. barnaricus</i> , <i>B. gelatini</i> , <i>B. decolorationis</i>
i	<i>B. carboniphilus</i> , <i>B. endophyticus</i> , <i>B. smithii</i>
j	<i>B. pallidus</i>
k	<i>B. funiculus</i> , <i>B. panaciterrae</i>

Fonte: Logan; De Vos, 2009.

### 3.3.1.1 Características do grupo *Bacillus cereus*

*Bacillus cereus* é uma espécie do gênero *Bacillus* e que pertence ao grupo de *B. cereus*, ainda nesse grupo incluem-se outras espécies como *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. thuringiensis*, *B. weihenstephanensis* e *B. anthracis*. Recentemente, foi descoberta uma nova espécie, *B. cytotoxicus*, que foi incluído nesse grupo (GUINEBRETIERE et al., 2013).

*B. cereus* tem características de bastonete aeróbio, formador de esporos esféricos. A temperatura mínima de crescimento é de, aproximadamente, 4 a 5 °C, com máxima de 48 a 50 °C e temperatura ótima de crescimento de 28 a 35 °C. Apresenta crescimento na faixa de pH entre 4,9 e 9,3 e concentração de sal de até 7,5 %. Seus esporos são resistentes ao calor e possui valor D variável, como D<sub>100</sub> entre 2,2 e 5,4 minutos. Pode ser encontrado no solo, poeira e água (JAY, 2005; BATT, 2014).

Esse micro-organismo é o responsável por gastroenterites alimentares devido a sua capacidade de produzir toxinas. Essas toxinas podem ser divididas em dois tipos causando duas doenças: síndrome emética e síndrome diarreica (JAY, 2005).

A síndrome diarreica é provocada por uma ou mais enterotoxinas. São três as toxinas mais importantes que implicam na doença, sendo elas a hemolisina BL (Hbl), enterotoxina não-hemolítica (Nhe) e citotoxina K (CytK). Entretanto, algumas outras citotoxinas, hemolisinas e enzimas degradativas também podem estar associadas à patogenicidade de *B. cereus* da síndrome diarreica, como cereolisina O, hemolisina II, hemolisina III, metaloprotease InhA2 e três fosfolipases C (ARNESEN et al., 2008). A doença apresenta sintomas como náuseas, raramente com vômitos, dores abdominais intermitentes, tenesmo, fezes aquosas e não há febre. Os sintomas se desenvolvem dentro de 8 a 16 horas, com duração de 6 a 12 horas (JAY, 2005). Essa doença se desenvolve quando o micro-organismo é ingerido junto com o alimento e a toxina é liberada no trato gastrointestinal. Isso ocorre, pois como *B. cereus* produz esporos termorresistentes, esses esporos podem germinar após o cozimento do alimento, se tornar células vegetativas e se multiplicar no alimento (MAY et al., 2016). É reportado que seja necessária uma dose de  $10^5$  a  $10^8$  células ou esporos para causar a doença, entretanto, doses baixas como  $10^3$  UFC/g podem ser suficientes para apresentar os sintomas (ARNESEN et al., 2008).

Já a síndrome emética é uma intoxicação causada por uma toxina conhecida como cereulídeo, sendo um dodecadepsipeptídeo cíclico classificada como um ionóforo e de estrutura [D-O-Leu-D-Ala-D-O-Val-D-Val] (EHLING-SCHULZ, 2004; JAY, 2005). A toxina possui um peso molecular de 1,2 kDa e é resistente ao calor de 121 °C por 30 minutos, às condições ácidas como do estômago e à proteólise, não sendo destruída pela ação das enzimas proteolíticas (ARNESEN et al., 2008). A doença emética é mais grave e aguda que a doença diarreica e tem como principal sintoma o vômito, e possui um período de incubação de 1 a 6 horas (JAY, 2005). Para o desenvolvimento dessa doença, a toxina deve ser formada previamente no alimento e, por ser termorresistente, não é eliminada durante o cozimento do alimento (MAY et al., 2016). Através de estudos em animais, foi reportado que uma dose de cereulídeo de 8-10 µg/kg de peso corpóreo já pode provocar os sintomas da doença (ARNESEN et al., 2008).

Não foram reportados casos de surtos de *B. cereus* envolvendo leite em pó tanto no Brasil como no exterior até o momento, entretanto existem casos envolvendo outros produtos lácteos.

Durante o período de 1993 a 2008, nos Estados Unidos houve apenas um relato de surto envolvendo produtos lácteos pasteurizados sendo *B. cereus* o agente etiológico. Dentro dessa categoria de alimentos, podemos citar queijo e leite fluido. As causas para o surgimento de surtos com esse tipo de alimento seriam a contaminação pós-pasteurização por

manipuladores, abuso de temperatura e armazenamento inadequados, pois os esporos são resistentes à pasteurização (LANGER et al., 2012; BENNETT et al., 2013).

Na Austrália houve 6 surtos causados por *B. cereus* durante o período de 2001 a 2013, porém nenhum estava relacionado ao consumo de leite ou produto derivado de leite. Entretanto, os surtos estavam relacionados ao consumo de massas e arroz (MAY et al., 2016).

No ano de 2014, no Brasil, houve um “recall” de leite achocolatado por causa de contaminação por *B. cereus*. De acordo com a avaliação laboratorial da empresa, houve uma falha de vedação entre duas tubulações (ANVISA, 2017).

Algumas pesquisas realizadas por Chitov et al. (2008), Wang et al. (2009), Haughton et al. (2010), Di Pinto et al. (2013), Hwang e Park (2015) e Organji et al. (2015) isolaram essa bactéria de fórmulas infantis à base de leite. Uma hipótese da ocorrência desse micro-organismo nesse tipo de alimento é que as fórmulas infantis são produzidas utilizando como base o leite em pó. Uma vez que o leite em pó esteja contaminado, poderá contaminar o produto final (fórmula infantil).

Além disso, os esporos de *B. cereus* podem sobreviver em alimentos desidratados e em ambientes de processamento desses produtos por longos períodos, e podem germinar e multiplicar após a reconstituição dos produtos que foram inadequadamente processados (BEUCHAT et al., 2013).

É observado a baixa ocorrência de *B. cereus* em amostras de leite em pó como reportado nos estudos de Reis et al. (2013), Milller et al. (2015) e Sadiq et al. (2016).

Entretanto, 22 de 30 amostras de leite em pó integral analisadas por Rezende-Lago et al. (2007) foram positivas para *B. cereus* representando 73,3 %. Nesse mesmo estudo, os autores pesquisaram a presença desse micro-organismo em mais 90 amostras de leite integral incluindo leite cru, leite pasteurizado e leite longa vida.

Foi verificada a presença de *B. cereus* em 13 de 110 amostras de leite UAT de 11 diferentes marcas analisadas (VIDAL-MARTINS et al., 2005). Os autores também verificaram que 8 das 11 marcas foram positivas para a presença de *B. cereus*, alegando ser um problema preocupante, podendo pôr em risco a saúde dos consumidores.

No estudo de Pacheco-Sanchez e Massaguer (2007), 6500 amostras de leite UHT de diferentes marcas brasileiras foram analisadas para verificar a presença de *B. cereus*. Como resultado, em nenhuma amostra foi verificada a presença desse micro-organismo. Os autores também verificaram a presença de outros micro-organismos, e um dentre os seis isolados foi identificado como *B. sporothermodurans*.

Em um estudo realizado por Martins et al. (2009), os autores analisaram 63 amostras de produtos lácteos, sendo 24 de sorvetes artesanais, 19 de creme de leite pasteurizado e 20 de patês de queijo. As contagens de *B. cereus* encontradas em amostras de sorvete variaram entre menor que 2,0 e 3,1 log UFC/g. Uma amostra de patê de queijo apresentou contagem de 4,5 log UFC/g se encontrando fora dos padrões estabelecidos pela RDC 12/2001 (BRASIL, 2001) que possui limite de até  $5 \times 10^2$  UFC/g. Duas amostras de creme de leite pasteurizado apresentaram uma contagem alta entre 6 e 7 log UFC/g.

Fernandes et al. (2014) analisaram 126 amostras obtidas em uma empresa processadora de ricota. Entre as amostras analisadas podemos destacar o leite cru, leite pasteurizado, soro de queijo, ricota antes e após a embalagem. Na primeira coleta, o leite pasteurizado apresentou uma contagem de 3 log UFC/mL, enquanto que o leite cru apresentava uma contagem menor que 2 log UFC/mL. Os autores explicam a possível presença de esporos no leite cru e que foram ativados durante a pasteurização. Uma amostra de soro de queijo também apresentava contagem de 3 log UFC/mL. Entre as amostras de ricota, 7 de 15 amostras de ricota antes da embalagem e 1 de 15 amostras após a embalagem apresentavam contagem acima de 2 log UFC/g. Como na legislação (BRASIL, 2001) não existe parâmetro de limite para *B. cereus* em ricota, os autores se basearam no limite de 2 log UFC/g para sobremesas lácteas pasteurizadas e refrigeradas.

Em um recente estudo, foi verificado a presença de *B. cereus* em 31 de 60 amostras de leite cru, em 49 de 60 de leite pasteurizado e em 25 de 180 de leite UHT, analisados a cada 30 dias desde o dia 0 até o dia 150, adquiridas de uma empresa. Foram isoladas 68 colônias, das quais 29 apresentaram potencial de produção de enterotoxina (VIDAL et al., 2016).

*Bacillus weihenstephanensis* que pertence ao grupo do *B. cereus* não demonstra a capacidade de produzir toxina (JENSON, 2014). Essa espécie se diferencia de todas as outras pela sua habilidade de crescer em temperaturas de refrigeração menores que 7 °C, mas não em temperatura de 43 °C (LECHNER et al., 1998).

Algumas cepas de *B. thuringiensis* possuem grande potencial de patogênese em humanos (JENSON, 2014). Porém, está mais relacionada ao controle biológico de insetos pela produção de uma  $\delta$ -endotoxina durante sua fase de esporulação (ARONSON; SHAI, 2001).

A espécie *B. anthracis* é conhecido por causar a doença antraz, ou carbúnculo, sendo fatal para animais e humanos. Também, foi conhecido por ser uma potencial arma biológica. As espécies *B. mycoides* e *B. pseudomycoides* são diferentes do *B. cereus*

fenotipicamente pelo formato rizoide da colônia no meio de cultura e pela sua composição de ácidos graxos (ARNESEN et al., 2008).

Outras espécies de *Bacillus* têm sido reportadas como causadores de doenças de origem alimentar, porém não são frequentes. Entre essas espécies, são citadas *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus* e *B. thuringiensis*. Isso se deve pela falta de métodos mais eficientes e dificuldade de distinguir essas espécies de outros *Bacillus* (JENSON, 2014). O método mais eficiente para identificação e distinção das espécies de *Bacillus* é o sequenciamento da região 16S do rDNA ou do gene *rpoB*, codificador da subunidade  $\beta$  do RNA polimerase, como demonstrado nos estudos de González et al. (2013), Miller et al. (2015), Kent et al. (2016) e Sadiq et al. (2016).

### 3.3.1.2 Características de *Bacillus sporothermodurans*

*Bacillus sporothermodurans* é um micro-organismo mesófilo aeróbio estrito, em forma de bastonete Gram positivo, móvel por flagelos peritríqueos, catalase positivo, fermenta açúcar sem produção de gás, não patogênico e pode ser encontrado em leite, produtos lácteos e alimentos enlatados (PETTERSSON et al., 1996; MONTANARI et al., 2004; SCHELDEMAN et al., 2006; OOMES et al., 2007). Embora seu crescimento não cause grandes mudanças sensoriais em leite UHT, pode causar grandes perdas econômicas, se essa contaminação exceder o critério de esterilidade adotado na União Europeia de 10 UFC por 0,1 mL (SCHELDEMAN et al., 2006).

Esse micro-organismo produz esporos altamente resistentes ao calor e pode sobreviver ao tratamento UHT (AOUADHI et al., 2014). Seus esporos possuem um valor  $D_{140}$  que varia de 3,4 a 7,9 segundos, podendo ser mais resistentes que os esporos de *G. stearothermophilus* (valor  $D_{140}=0,9$  segundos) (HUEMER et al., 1998).

Van Zuijlen et al. (2010) observaram que *B. sporothermodurans* seria um micro-organismo mais adequado para avaliar e otimizar o processo de esterilização comercial de alimentos de baixa acidez.

Vários estudos são relatados sobre a presença de *B. sporothermodurans* em leite UHT, porém não há estudos relatados em leite em pó.

Zacarchenco et al. (2000) estudaram a ocorrência de *B. sporothermodurans* em leite UHT produzido no Brasil. Os autores analisaram 100 amostras de 9 marcas diferentes com diferentes tipos de processamento (aquecimento direto com injeção de vapor a 150 °C por 3 segundos ou aquecimento indireto por placa ou tubo com temperatura entre 137 e 140

°C por 3 ou 4 segundos). Do total de amostras, 45 apresentavam contagem variando de  $2 \times 10^4$  a  $9,5 \times 10^5$  UFC/mL e 55 amostras foram positivas para a presença de esporos de bacilos de alta resistência ao calor após choque térmico de 115 °C por 7 minutos. Foram 24 isolados com características morfológicas e bioquímicas típicas, e identificados como *B. sporothermodurans* pela técnica de RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*).

No estudo de Montanari et al. (2004), os pesquisadores analisaram 199 amostras de leite UHT e utilizaram ágar BHI (*Brain Heart Infusion*) e PCA (*Plate Count Agar*) para isolar *B. sporothermodurans*. Das amostras totais, 125 foram positivas e observaram que no PCA não houve um bom crescimento, enquanto que no ágar BHI adicionado de 1 mg/L de vitamina B12 ocorreu um melhor desenvolvimento. As cepas isoladas apresentaram características similares à cepa padrão (DSMZ 10599<sup>T</sup>), como bastonete Gram positivo, catalase positivo, teste de VP negativo, hidrólise de caseína positivo e hidrólise de gelatina e amido negativo, citrato negativo, com crescimento até 2 % de sal e crescimento fraco em 5 %, e crescimento entre 20 e 45 °C.

Em outro estudo em leite UHT realizado por Busatta et al. (2005), 88 amostras de leite UHT integral e desnatado de 11 marcas diferentes foram avaliadas. Os autores observaram que 6 marcas apresentaram contaminação com *B. sporothermodurans*. Além disso, foi observado que a contaminação ocorreu em maior índice nas amostras de leite desnatado do que em relação ao leite integral. Os autores explicam que no leite desnatado há uma maior quantidade de oxigênio difundido facilitando o desenvolvimento do micro-organismo, por se tratar de uma bactéria aeróbia estrita.

### 3.3.2 Características de *Geobacillus stearothermophilus*

*Geobacillus stearothermophilus* é um bastonete Gram-positivo termófilo, aeróbio, com capacidade de produzir esporos resistentes às altas temperaturas e tem como temperatura ótima de crescimento entre 55 °C e 65 °C. A temperatura máxima para crescimento é de 75 °C e mínima de 40 °C. Não consegue crescer em temperatura de 37 °C. Possui a capacidade de hidrolisar amido e caseína e reduzir nitrato em nitrito. Consegue crescer em até 5 % de sal. O pH mínimo para crescimento é 5,2 e a atividade de água mínima é 0,93 (NAZINA et al., 2001; KOTZEKIDOU, 2014).

Pode ser isolado de leite e produtos lácteos, e está associado à deterioração do tipo “flat-sour” em alimentos. A deterioração do tipo “flat-sour” é o resultado da fermentação dos carboidratos presentes no alimento em ácidos orgânicos sem a produção de gás

(KALOGRIDOU-VASSILIADOU, 1992). Por exemplo, estima-se que mais de 50 % do leite em pó produzido no mundo está contaminado com este micro-organismo, representando mais de 10 % dos isolados termófilos (DURAND et al., 2015).

Os esporos de *G. stearothermophilus* são muito utilizados como indicadores biológicos para avaliar a eficiência de processos de esterilização (PHILLIPS; GRIFFITHS, 1986). Em procedimentos de esterilização com vapor em que são utilizadas temperaturas de 121 °C ou acima são muito utilizadas as cepas de *G. stearothermophilus* NCTC 10007, NCIB 8157 e ATCC 7953 (KOTZEKIDOU, 2014).

Adiguzel et al. (2009) isolaram micro-organismos termófilos de fontes termais na região da Turquia. Entre os isolados estudados, foram encontrados os gêneros: *Bacillus*, *Anoxybacillus* e *Geobacillus*. Essas cepas apresentaram características de bastonetes Gram positivo, móveis, catalase e oxidase positivos, termófilos. O pH e temperatura ótima de crescimento estava na faixa de 7,5 a 10 e  $56 \pm 1$  °C, respectivamente. Além disso, apresentaram crescimento na faixa de concentração de 2-4 % de sal. Também fizeram a análise por técnicas de rep-PCR (GTG)<sub>5</sub>- e BOX-PCR para caracterização genética e filogenética desses bacilos.

Em um estudo realizado por Prevost, Andre e Remizes (2010), os autores analisaram 34 amostras de alimentos enlatados. Em 7 amostras, das quais se incluem conserva à base de peixe enlatado, carne enlatada, milho enlatado e bolinho de carne enlatado, foi identificado a presença de *G. stearothermophilus* pela análise de PCR amplificando a região entre as subunidades 16S-23S do rRNA.

### 3.4 Métodos moleculares

Muitas técnicas têm sido desenvolvidas para a detecção de micro-organismos patogênicos de alimentos, dentre elas podemos citar métodos de plaqueamento, métodos moleculares, métodos imunológicos, microscopia, espectroscopia e bioluminescência, apresentando uma variação entre elas de custo, especificidade, sensibilidade e facilidade de uso. Diversas técnicas moleculares surgiram oferecendo vantagens na velocidade de detecção juntamente com a especificidade e sensibilidade. Os métodos moleculares também têm provido vantagens em casos onde há dificuldade do cultivo do micro-organismo alvo, como no caso de vírus (GORSKI; CSORDAS, 2010).

Os métodos moleculares se tornaram uma ferramenta indispensável, sendo métodos rápidos na detecção e identificação de micro-organismos patogênicos em amostras

de alimentos. A precisão da caracterização do micro-organismo ao nível de espécie e linhagem é muito importante, principalmente para os grupos que necessitam de monitoramento constante na indústria de alimento. Têm sido desenvolvidas várias metodologias em biologia molecular para diminuir o tempo gasto nas análises e evitar ambiguidade na identificação do organismo-alvo (ROZA, 2004; GORSKI; CSORDAS, 2010).

Atualmente, existem vários métodos de biologia molecular para identificação de micro-organismos, como PCR (*Polymerase Chain Reaction*), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), REP-PCR (*Repetitive Sequence Element*), ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*), entre outros (RONIMUS et al., 2003).

A técnica da PCR é um método de amplificação das sequências de DNA *in vitro*. A reação procede em função de diferentes fases de temperatura de desnaturação do DNA, anelamento do primer e extensão. Os reagentes utilizados na reação para PCR incluem uma enzima termoestável DNA polimerase, trifosfatos desoxirribonucleotídeos (dNTPs), *primers* selecionados que se ligam em sequências específicas do DNA, cloreto de magnésio e o DNA alvo (GORSKI; CSORDAS, 2010). O procedimento consiste na utilização de um par de *primers* curtos sintetizados quimicamente, de tamanho de 15 a 20 pares de bases, que se ligam a uma ponta do gene ou região do genoma a ser amplificado. E então, a enzima DNA polimerase adicionam as bases nucleicas (dNTPs) a esses *primers*, iniciando o processo de polimerização, formando um número crescente de moléculas de DNA. O processo é rápido precisando de minutos a horas para gerar sequências suficientes para detecção (GRIFFITHS et al., 2009).

Diversos estudos têm utilizado técnicas moleculares para a identificação de bacilos aeróbios em alimentos e ambiente.

No estudo realizado por Ronimus et al. (2003), foram isolados diversos bacilos termófilos de amostras de leite concentrado e leite em pó de uma indústria processadora localizada na Nova Zelândia, e esses foram identificados por meio da técnica de RAPD. Foram identificados a presença de *G. stearothermophilus*, *A. flavithermus*, *B. licheniformis* e *B. subtilis*. Além disso, a técnica de RAPD utilizada demonstrou uma grande eficiência para a identificação de bacilos termófilos isolados de amostras de leite.

Reis et al. (2013) avaliaram a presença do gene de produção da toxina Hbl em *B. cereus* isolados de produtos lácteos. Os autores analisaram 260 amostras que incluíam leite pasteurizado, leite UHT e leite em pó. Foram obtidos 63 isolados, sendo 36 de leite pasteurizado, 15 de leite em pó e 12 de leite UHT. Realizaram a detecção dos genes *hblD*,

*hblC* e *hblA* que codificam os três componentes da toxina. Obtiveram que 23 isolados carregavam os três genes e 37 isolados carregavam pelo menos um dos genes. Dentro desses 23 isolados que foram identificados com os três genes, 14 foram isolados de leite pasteurizado e 9 de leite em pó, e nenhum isolado de leite UHT carregavam algum dos genes.

Em outro estudo realizado por Miller et al. (2015), foi verificado a presença de diversos bacilos mesófilos e termófilos em leite cru e em produtos lácteos em pó (concentrados proteicos e leite em pó desnatado). Entre os isolados foram identificados, utilizando o sequenciamento do gene *rpoB*, o grupo do *B. cereus*, *Anoxybacillus* spp., *Geobacillus* spp. e *B. licheniformis* nos produtos lácteos em pó.

No estudo de Durand et al. (2015) foram avaliadas 127 cepas diferentes de *G. stearothermophilus* isolados de produtos enlatados quanto à discriminação genética por técnicas de sequenciamento de DNA e PCR. O sequenciamento do DNA da região do gene *panC*, que codifica a produção de enzima pantoato-β-alanina ligase, demonstrou não ser eficiente na discriminação filogenética dos isolados, assim como pela técnica de REP-PCR. Entretanto, utilizando-se a técnica de M13-PCR, uma técnica de PCR baseada na sequência de um colifago M13 que se repete em diversos genomas e utilizado para discriminação de isolados de bactérias intra-específicos, houve uma maior discriminação genética. Isso se deve a pouca diversidade em *G. stearothermophilus*.

Isolados de *B. cereus* obtidos por Vidal et al. (2016) foram submetidos à análise de RAPD-PCR para verificar se tratava-se da mesma cepa que conseguia resistir às condições de pasteurização e tratamento ultra alta temperatura do leite. Esses isolados foram divididos em 5 grupos e algumas cepas demonstraram similaridade genética, ou seja, apresentaram resistência térmica em toda a cadeia de produção do leite UHT.

Sadiq et al. (2016) analisaram 25 amostras de leite em pó, que incluíam fórmula infantil, leite em pó desnatado e integral. Os isolados foram identificados pela técnica de RAPD-PCR utilizando o primer OPR-13 e pelo sequenciamento do gene rRNA da região do 16S. O micro-organismo mais prevalente foi *B. licheniformis*, e a fonte dessa bactéria pode ser o solo e o silo de armazenamento. Também foi isolado *G. stearothermophilus*, *A. flavithermus* e, em menor ocorrência, o grupo de *B. cereus*.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Coleta de amostras

A amostragem consistiu de 80 amostras de leite em pó de lotes diferentes de 14 marcas diferentes adquiridos de diversos estabelecimentos comerciais localizados na cidade de Campinas/SP. As amostras do tipo integral, integral instantâneo, desnatado, desnatado instantâneo e semi-desnatado, conforme a Tabela 3, foram analisadas. A quantidade de amostras de cada marca analisada está apresentada na Tabela 4.

**Tabela 3 - Quantidade de amostras analisadas por tipo de leite**

<b>Tipo de leite em pó</b>	<b>Quantidade de amostras</b>
Integral	27
Integral Instantâneo	27
Desnatado	3
Desnatado Instantâneo	17
Semi-desnatado	6

**Tabela 4 - Quantidade de amostras analisadas por marca**

<b>Marca</b>	<b>Quantidade de amostras</b>
A	10
B	10
C	4
D	18
E	5
F	3
G	3
H	3
I	5
J	4
K	3
L	3
M	6
N	3

#### 4.2 Contagem e identificação de células vegetativas e esporos de *B. cereus*

A unidade analítica de 25 g da amostra foi reconstituída e homogeneizada em 225 mL de água peptonada (peptona 0,1%; DIFCO). A partir desta diluição, foi realizada diluição decimal seriada subsequente até  $10^{-2}$  e 0,1 mL de cada diluição foi inoculado em placas de Petri contendo Ágar Manitol Gema de Ovo Polimixina (MYP; HIGHMEDIA) e incubados a 30 °C por 48 h em aerobiose (BENNETT; BELAY, 2001). Após incubação, as colônias típicas foram contadas e até 5 colônias de cada placa foram transferidas para tubo com Ágar Triptona de Soja (TSA; DIFCO) inclinado e incubadas por 24 horas a 35 °C e mantidas a 4-7 °C para posterior identificação.

Para identificação, foram realizadas a caracterização morfológica pela coloração de Gram e os testes bioquímicos: utilização de glicose em anaerobiose em caldo vermelho fenol, redução de nitrato, teste Voges-Proskauer (VP), decomposição da tirosina, teste de motilidade, presença de cristais de toxinas, crescimento rizoide, teste de hemólise, conforme metodologia da *American Public Health Association* – APHA (BENNETT; BELAY, 2001).

Para contagem de esporos de *B. cereus* 10 mL da diluição  $10^{-1}$  foi submetido a choque térmico para 80 °C por 10 minutos (VITTORI et al., 2008). Após resfriamento rápido, foi realizada diluição decimal até  $10^{-2}$ . As diluições foram inoculadas em MYP e incubadas a 30 °C por 48 h. Após a incubação, as colônias foram contadas e a identificação de isolados foi realizada conforme descrito acima.

#### 4.3 Detecção de genes codificadores de enterotoxinas Nhe e Hbl de *B. cereus*

Os genes *nheA*, *nheB* e *nheC* codificadores da enterotoxina não hemolítica (NHE) e dos genes *hblA*, *hblC* e *hblD* codificadores da hemolisina BL (HBL) foram detectados pela técnica de PCR.

##### 4.3.1 Extração de DNA dos isolados de *B. cereus*

A extração do DNA dos isolados foi realizada conforme descrito em Hansen e Hendriksen (2001) com modificações. As culturas foram reativadas em caldo BHI e incubadas em *shaker* (Controlled Environment Incubator Shaker; NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC CO.) a 150 rpm, a 32 °C por 18 a 20 horas.

A partir do crescimento, 250  $\mu\text{L}$  da cultura foi transferido para um microtubo de 1,5 mL e centrifugada a 13000 x *g* (Heraeus Fresco 17 Centrifuge; THERMO SCIENTIF) por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* formado foi ressuspensionado em 100  $\mu\text{L}$  de tampão Tris-EDTA (Tris 10mM, EDTA 1mM; pH = 8,0). O microtubo foi colocado em banho-maria em temperatura de fervura (100 °C) por 10 minutos, seguido de um resfriamento rápido. Após esse tratamento, o microtubo foi centrifugado a 13000 x *g* por 3 minutos para decantação do resíduo e o DNA no sobrenadante foi separado e estocado em freezer a -18 °C.

#### 4.3.2 Amplificação dos genes codificadores de enterotoxinas

Para a detecção dos genes de enterotoxina NHE e HBL nos isolados de *B. cereus* seguiu-se a metodologia descrita por Hansen e Hendriksen (2001).

As amplificações foram realizadas em termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradient; EPPENDORF). A sequência dos primers (INVITROGEN BY THERMO FISHER SCIENTIFIC) utilizados no estudo estão descritos na Tabela 5.

O controle positivo utilizado na reação foi *Bacillus cereus* NCTC 1143 cedido pelo Laboratório de Higiene e Legislação do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas (DTA-FEA-UNICAMP/ Campinas – SP).

A reação de PCR foi realizada em tubos com 25  $\mu\text{L}$  contendo 1  $\mu\text{L}$  do DNA, 0,2 mM de dNTPs (SINAPSE INC.), 1x *Taq Buffer*, 1,5 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 0,5  $\mu\text{M}$  de cada primer e 1 unidade de *Taq polymerase* (SINAPSE INC.).

As etapas de amplificação para os genes *nheA*, *nheB*, *hblA*, *hblC* e *hblD* seguiram-se de acordo com o ciclo modificado proposto: ciclo inicial de 94 °C por 2 minutos, 35 ciclos repetidos de 94 °C por 45 segundos, 55 °C por 45 segundos e 72 °C por 1 minuto, e o ciclo final de extensão de 72 °C por 5 minutos.

Para a detecção do gene *nheC* seguiu-se de acordo com o ciclo modificado proposto: ciclo inicial de 94 °C por 2 minutos, 35 ciclos repetidos de 94 °C por 45 segundos, 50 °C por 45 segundos e 72 °C por 1 minuto, e o ciclo final de extensão de 72 °C por 5 minutos.

Após a amplificação, os amplicons foram analisados por eletroforese em gel de agarose (INVITROGEN) a 1,5 % em Solução Tampão Tris-Borato-EDTA 0,5X (Solução 10X: Tris 0,89M, EDTA 0,02M, Ácido Bórico 0,89M; pH = 8,0) corados em Sybr Safe Green

(INVITROGEN), visualizados em transiluminador UV e fotodocumentados (GEL LOGIC 200 IMAGING SYSTEM).

Tabela 5 - Sequência dos nucleotídeos

Micro-organismo	Nome do oligonucleotídeo	Gene codificador	Sequência (5' → 3')	Tamanho do produto (bp)	Referência
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	Fits2	ITS 16-23S do rRNA	GGG GAA GCG CCG CGT TCG G	302	Prevost, Andre e Remizes (2010)
	Rits2		GTG CAA GCA CCC TTG CAG GCG AAG A		
<i>Bacillus sporothermodurans</i>	BSPO-F2	16S rRNA	ACG GCT CAA CCG TGG AG	664	Scheldeman <i>et al.</i> (2002)
	BSPO-R2		GTA ACC TCG CGG TCT A		
<i>Bacillus cereus</i>	NheA-S	<i>nheA</i>	TAC GCT AAG GAG GGG CA	500	Hansen e Hendriksen (2001)
	NheA-A		GTT TTT ATT GCT TCA TCG GCT		
	NheB-S	<i>nheB</i>	CTA TCA GCA CTT ATG GCA G	770	
	NheB-A		ACT CCT AGC GGT GTT CC		
	NheC-S	<i>nheC</i>	CGG TAG TGA TTG CTG GG	582	
	NheC-A		CAG CAT TCG TAC TTG CCA A		
	HBLA1	<i>hblA</i>	GTG CAG ATG TTG ATG CCG AT	320	
	HBLA2		ATG CCA CTG CGT GGA CAT AT		
	L1A	<i>hblD</i>	AAT CAA GAG CTG TCA CGA AT	430	
	L1B		CAC CAA TTG ACC ATG CTA AT		
L2A	<i>hblC</i>	AAT GGT CAT CGG AAC TCT AT	750		
L2B		CTC GCT GTT CTG TTA AT			

#### **4.4 Contagem da população de esporos de bactérias aeróbias mesófilas**

A análise de esporos de bactérias aeróbias mesófilas foi realizada conforme Frank e Yousef (2004) com modificações. A partir da amostra diluída ( $10^{-1}$ ) no item 4.2, uma alíquota de 10 mL foi transferida para um tubo estéril e submetida a choque térmico de 80 °C por 12 minutos com posterior resfriamento rápido em banho de gelo. Foi feita uma diluição decimal seriada até  $10^{-2}$  e 1 mL de cada diluição foi inoculado em Ágar Padrão para Contagem (PCA; DIFCO) com 0,1 % de amido solúvel pela técnica de *Pour Plate* (profundidade). As placas foram incubadas a 35 °C por 48 h. As colônias foram contadas e até 5 colônias de cada placa foram mantidas em TSA sob refrigeração.

#### **4.5 Contagem da população de esporos de bactérias aeróbias termófilas**

A análise de esporos de bactérias aeróbias termófilas foi realizada conforme Olsen e Sorrells (2001) com modificações. A partir da amostra diluída ( $10^{-1}$ ) no item 4.2, 10 mL foram transferidos para um tubo estéril e submetido a choque térmico a 100 °C por 30 minutos. Após resfriamento rápido em banho de gelo, foi feita uma diluição decimal até  $10^{-2}$  e 0,1 mL de cada diluição foi inoculado em Ágar Dextrose Triptona (DTA; ACUMEDIA) pela técnica de plaqueamento em superfície. As placas foram incubadas a 55 °C por 72 h. Após incubação, as colônias foram contadas e até 5 colônias de cada placa foram mantidas em TSA sob refrigeração para posterior identificação.

#### **4.6 Contagem de esporos de bacilos de alta resistência ao calor**

A partir da amostra diluída ( $10^{-1}$ ) no item 4.2, 10 mL foram transferidos para um tubo estéril e submetido a choque térmico de 100 °C por 30 minutos e, após resfriamento rápido, foi realizada uma diluição decimal até  $10^{-2}$ . De cada diluição, 0,1 mL foi inoculado na superfície de placas com Ágar Infusão de Cérebro e Coração (BHI; DIFCO) suplementado com vitamina B12 (1 mg/L, SIGMA-ALDRICH) de acordo com Montanari et al. (2004). Após a incubação das placas a 35 °C por 48 h, as colônias foram contadas e até 5 colônias de cada placa foram mantidos em ágar BHI sob refrigeração para posterior identificação.

## **4.7 Identificação dos isolados de bacilos aeróbios termófilos e bacilos altamente resistente ao calor por PCR**

### **4.7.1 Extração de DNA dos isolados**

A extração do DNA dos isolados foi realizada conforme descrito em Furrer *et al.* (1991). Para a identificação de *Geobacillus stearothermophilus* a partir dos isolados de bacilos termófilos, as culturas foram reativadas em Caldo Triptona de Soja (TSB; SIGMA-ALDRICH) e incubados por 24 h a 55 °C. Os isolados de bacilos de alta resistência ao calor foram inoculados em caldo BHI suplementado com vitamina B12 (1 mg/L) e incubados por 24 h à 35 °C.

A partir do crescimento, 600 µL da cultura foram transferidas para um microtubo de 1,5 mL e centrifugado a 16200 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* formado foi ressuspenso em 95 µL de Tampão PCR 1x e tratados com 4 µL de lisozima (50 mg/mL; FISHER SCIENTIFIC) por 15 minutos em temperatura ambiente, e então digeridos com 1 µL de proteinase K (20 mg/mL; SIGMA-ALDRICH) a 58 °C por 60 minutos. Por fim, os microtubos foram colocados em banho-maria a 95 °C por 6 min e estocados em freezer a -18 °C.

### **4.7.2 Identificação de *Geobacillus stearothermophilus***

Os isolados de bacilos aeróbios termófilos foram submetidos à identificação de *G. stearothermophilus* utilizando o método de PCR. Para isso, seguiu-se a metodologia descrita por Prevost, Andre e Remizes (2010).

As amplificações ocorreram na região ITS 16-23S do rRNA em termociclador. Os oligonucleotídeos (INVITROGEN BY THERMO FISHER SCIENTIFIC) utilizados no estudo estão descritos na Tabela 5.

O controle positivo utilizado na reação foi *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 doado pelo Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos do Instituto de Tecnologia de Alimentos (CCQA-ITAL/ Campinas – SP).

A preparação do mix de PCR foi realizada em tubos com 25 µL de reação contendo 5 µL do DNA, 0,2 mM de dNTPs, 1x *Taq Buffer*, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,3 µM de cada primer e 2 unidades de *Taq polymerase*.

As etapas de amplificação seguiram-se de acordo com o ciclo proposto: 94 °C por 3 minutos, 40 ciclos repetidos de 94 °C por 1 minuto, 65 °C por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto, e o ciclo final de extensão de 72 °C por 10 minutos. Após a amplificação, os amplicons foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5 % em TBE 0,5x, corados em Sybr Safe Green, visualizados em transiluminador UV e fotodocumentados.

#### **4.7.3 Identificação de *Bacillus sporothermodurans***

A identificação de *B. sporothermodurans* foi realizada utilizando-se o método de PCR a partir dos isolados de bacilos com esporo de alta resistência ao calor. Para isso, seguiu-se a metodologia descrita por Scheldeman et al. (2002).

As amplificações ocorreram na região 16S do rRNA em termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient. Os primers (INVITROGEN BY THERMO FISHER SCIENTIFIC) utilizados no estudo estão descritos na Tabela 5.

O controle positivo utilizado na reação foi *Bacillus sporothermodurans* DSM 10599 doado pelo Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos do Instituto de Tecnologia de Alimentos (CCQA-ITAL/ Campinas – SP).

A reação foi realizada em tubos contendo 1 µL do DNA, 0,2 mM de dNTPs, 1x *Taq Buffer*, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,3 µM de cada primer e 1,5 unidades de *Taq polymerase*, totalizando 50 µL de reação. Todos os reagentes utilizados foram adquiridos da Sinapse Biotecnologia (SINAPSE INC.).

As etapas de amplificação seguiram-se de acordo com o ciclo proposto: 95 °C por 3 minutos, 30 ciclos repetidos de 95 °C por 15 segundos, 60 °C por 15 segundos e 72 °C por 30 segundos, e o ciclo final de extensão de 72 °C por 8 minutos. Após a amplificação, os amplicons foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% em TBE 0,5x, corados em Sybr Safe Green, visualizados em transiluminador UV e fotodocumentados.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Contagem de células vegetativas e esporos de *Bacillus cereus*

Todas as colônias que apresentavam como característica colônia rosa e rugosa com formação de halo de precipitação de lecitina devido à ação da lecitinase em MYP foram consideradas como típicas do grupo de *B. cereus*. Dessa forma, foram obtidos 48 isolados e com o auxílio dos testes bioquímicos, foi possível a identificação desses isolados. Todos os isolados que apresentaram resultados conforme a Tabela 6 foram confirmados como *B. cereus*. Entretanto, para os testes de redução de nitrato e VP, também foram considerados os isolados que apresentaram como resultado negativo, uma vez que algumas cepas podem apresentar esse tipo de resultado (MOSSEL et al., 1967; TALLENT et al., 2012).

**Tabela 6 - Resultado esperado dos testes bioquímicos de *B. cereus***

Teste	Resultado esperado
Morfologia	Bastonete
Gram	Positivo
Crescimento em presença de lisozima	Positivo
Fermentação da glicose em anaerobiose	Positivo
Redução de nitrato	Positivo
Teste de VP	Positivo
Decomposição de tirosina	Positivo
Formação de cristais de toxina	Negativo
Motilidade	Variável
Hemólise	Halo de $\beta$ -hemólise

Fonte: Bennett; Belay, 2001.

O intervalo de contagem de células vegetativas e esporos de *B. cereus* em leite em pó de cada marca está descrito nas Tabelas 7 e 8. A distribuição de células vegetativas foi maior que a de esporos nas amostras analisadas (Tabela 9). As contagens de células vegetativas variaram de menor que 2,00 log UFC/g (limite de detecção) a 2,60 log UFC/g em 9 marcas e as de esporos de menor que 2,00 log UFC/g a 3,00 log UFC/g em 3 marcas.

**Tabela 7 – Intervalo de contagem de células vegetativas de *B. cereus* em leite em pó por marca**

Marca	Contagem de células vegetativas (log UFC/g)
A	<2,00
B	<2,00 - 2,00
C	<2,00
D	<2,00 - 2,60
E	<2,00 - 2,00
F	<2,00 - 2,00
G	<2,00
H	<2,00 - 2,48
I	<2,00
J	<2,00 - 2,30
K	<2,00 - 2,30
L	<2,00
M	<2,00 - 2,00
N	<2,00 - 2,00

**Tabela 8 – Intervalo de contagem de esporos de *B. cereus* em leite em pó por marca**

Marca	Contagem de esporos (log UFC/g)
A	<2,00
B	<2,00
C	<2,00
D	<2,00 - 2,70
E	<2,00
F	<2,00
G	<2,00
H	<2,00
I	<2,00
J	<2,00
K	<2,00
L	<2,00 - 2,00
M	<2,00
N	<2,00 - 3,00

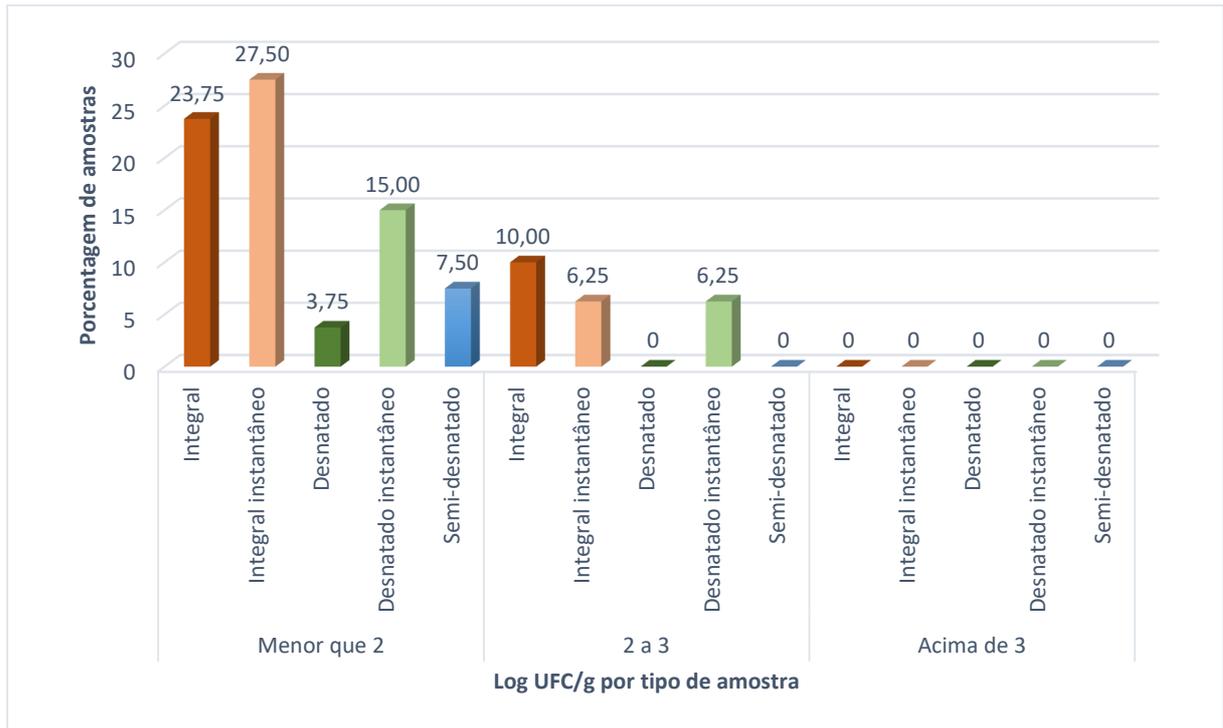
A maioria das amostras apresentou contagem menor que 2,00 log UFC/g tanto para célula vegetativa quanto para esporos de *B. cereus*, sendo, respectivamente, 62 (77,50 %)

e 75 (93,75 %) amostras, como observado na Tabela 9. As distribuições de amostras contaminadas com células vegetativas e esporos nos diferentes tipos de amostras de leite em pó estão apresentadas nas Figuras 1 e 2, respectivamente. Também, se observa que apenas 1 amostra apresentou contagem próxima de 3 log UFC/g. Os resultados são semelhantes aos encontrados por Reis et al. (2013), Miller et al. (2015) e Sadiq et al. (2016), em que foi encontrada baixa ocorrência do micro-organismo no leite em pó.

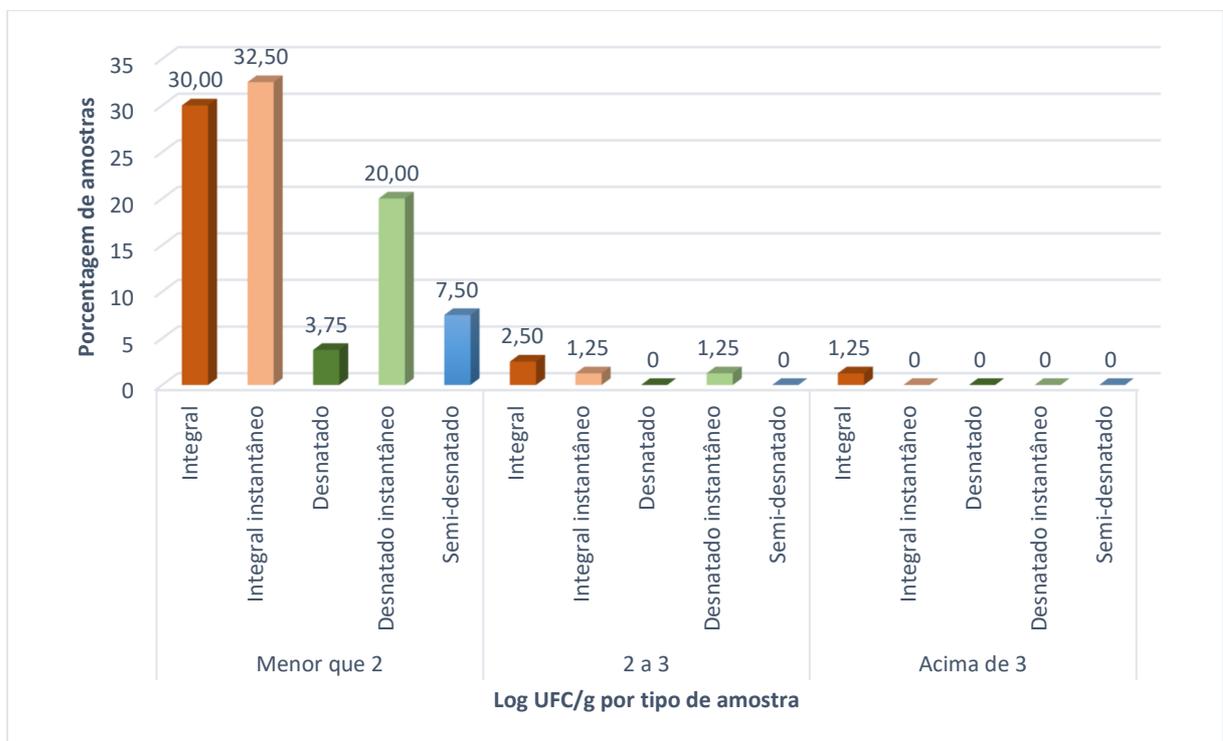
**Tabela 9 - Distribuição de amostras em relação a contagem de *B. cereus***

	Número de amostras (%)		
	< 2,00 log UFC/g	2,00 a 3,00 log UFC/g	> 3,00 log UFC/g
Célula vegetativa	62 (77,50)	18 (22,50)	0 (0)
Esporo	75 (93,75)	4 (5,00)	1 (1,25)

Observa-se que nenhuma marca apresentou contagem acima do padrão microbiológico estabelecido para leite em pó pela RDC 12/2001 (BRASIL, 2001) de  $5 \times 10^3$  UFC/g, que equivale a 3,7 log UFC/g. Também é notável que uma amostra da marca “D” e uma amostra da marca “N” apresentaram as maiores contagens para célula vegetativa e espora, respectivamente, porém ainda aceitável. Isso demonstra que pode ter ocorrido uma falha na higienização dos equipamentos ou que o micro-organismo sobreviveu ao processamento do leite em pó.



**Figura 1 - Distribuição das amostras contaminadas com célula vegetativa de *B. cereus* por tipo de amostra de leite em pó**



**Figura 2 - Distribuição das amostras contaminadas com esporo de *B. cereus* por tipo de amostra de leite em pó**

No presente estudo foi detectado a presença do micro-organismo na forma vegetativa em 18 amostras (22,50 %) e na forma esporulada em apenas 5 amostras (6,25 %)

do total analisado. Também, em 3 amostras foram detectados a presença tanto de células vegetativas quanto de esporos. Além disso, foi verificada que em 10 (71,43 %) das 14 marcas analisadas foi detectada a presença da bactéria.

No estudo de Rezende-Lago et al. (2007) foi detectada a presença de *B. cereus* em 22 de 30 amostras (73,33 %) de leite em pó analisadas, ocorrência maior do que a encontrada neste trabalho.

De modo geral, as amostras instantâneas estavam mais contaminadas que as amostras não instantâneas. Uma hipótese para esse fato pode ser a adição de lecitina de soja ao leite em pó instantâneo para aumentar sua dispersabilidade, sendo que a lecitina pode ser uma fonte de contaminação para o produto final.

Nas amostras de leite em pó desnatado, exceto leite em pó desnatado instantâneo, ocorreu uma baixa ocorrência de *B. cereus*. Isso pode ocorrer porque durante o desnate do leite, micro-organismos esporulados, células somáticas e outras sujidades podem ser separadas junto com o creme (WILBEY, 2002; GHODDUSI, OZER; 2015).

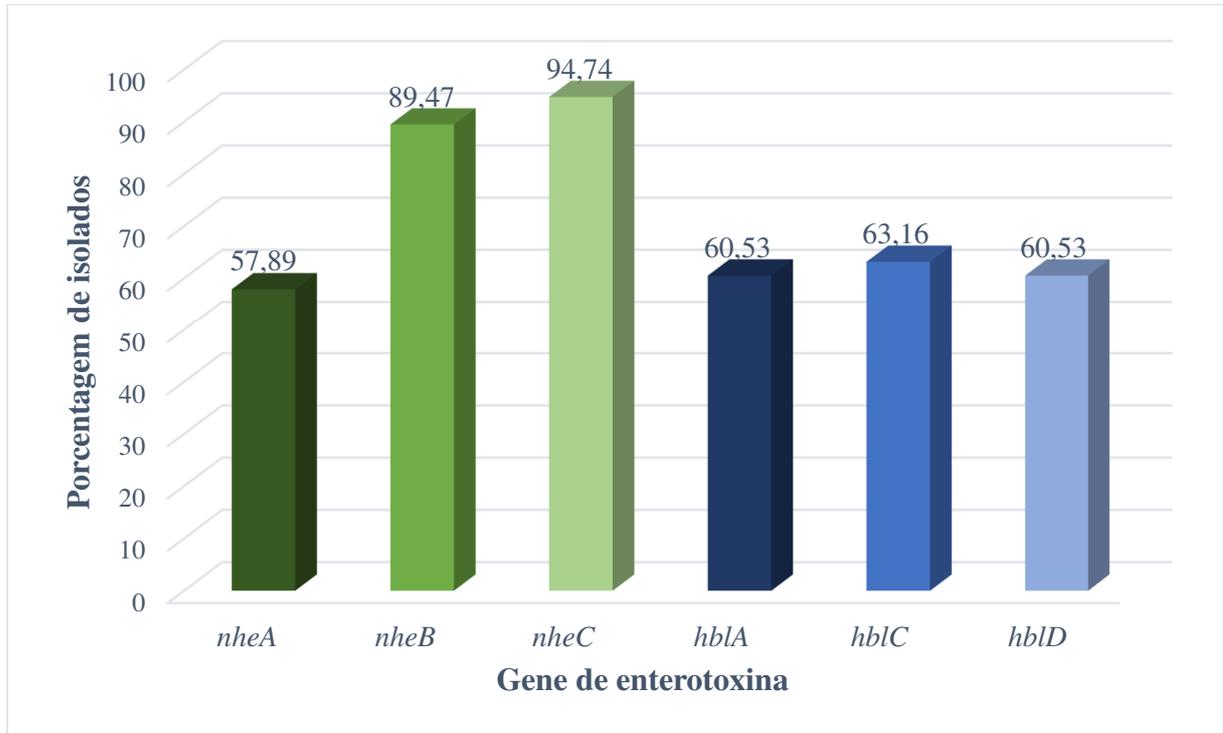
Comparando-se os resultados, foi possível observar que a contagem de células vegetativas e esporos de *B. cereus* foram diferentes entre as amostras da mesma marca. Com isso, podemos dizer que essa contaminação possa ser proveniente da matéria-prima influenciando diretamente a qualidade do produto final.

Contudo, uma vez realizada a reconstituição do leite em pó em temperatura ambiente e ficar exposto em condições inadequadas, como fora de refrigeração por longos períodos, por exemplo, pode ocorrer a proliferação do micro-organismo e causar doença e/ou surto após a ingestão desse alimento. Da mesma forma, quando é realizada a reconstituição com água quente ou submetido a uma etapa que envolva o aquecimento, pode ocorrer a ativação e germinação dos esporos de *B. cereus*, favorecendo a proliferação da bactéria no alimento, resultando em uma doença e/ou surto.

## **5.2 Detecção de genes de virulência de *Bacillus cereus***

Dentre os 48 isolados suspeitos, 38 foram identificados como *B. cereus* pelos testes bioquímicos e foram submetidos à técnica da PCR para detecção dos genes de virulência, *nheA*, *nheB*, *nheC*, *hblA*, *hblC* e *hblD*, codificadores de NHE e HBL, responsáveis pela doença diarreica. Destes isolados, 57,89 % (22/38) apresentaram a presença do gene *nheA*, 89,47 % (34/38) para o gene *nheB*, 97,74 % (36/38) para o gene *nheC*, 60,53 % (23/38) para o gene *hblA*, 63,16 % (24/38) para o gene *hblC* e 60,53 % (23/38) para o gene *hblD*,

como descrito na Figura 3. Os perfis dos genes de virulência de cada isolado estão apresentados na Tabela 10.



**Figura 3 - Porcentagem de isolados positivos para presença de genes de enterotoxinas**

**Tabela 10 – Resultado individual dos genes de virulência dos isolados de *B. cereus***

Numeração do isolado	Complexo Nhe			Complexo Hbl		
	<i>nheA</i>	<i>nheB</i>	<i>nheC</i>	<i>hblA</i>	<i>hblC</i>	<i>hblD</i>
16	+	+	+	-	-	-
19	+	+	+	+	+	+
106	+	+	+	+	+	+
107	-	+	+	-	-	-
108	+	+	+	+	+	+
173	-	+	+	-	+	+
174	-	+	+	-	+	-
176	+	+	+	-	+	-
177	+	-	+	-	-	-
297	+	+	+	-	-	-
298	+	+	+	+	+	+
300	+	+	+	+	+	+
307	+	+	+	-	-	-
317	+	+	+	-	+	+
352	-	+	+	+	+	+
354	-	-	+	+	-	-
356	-	-	+	-	+	+
357	-	-	-	-	+	+
358	+	+	+	+	+	+
360	+	+	+	+	+	+
361	+	+	+	+	+	+
362	+	+	+	+	-	+
363	-	+	+	+	+	+
364	+	+	+	+	+	+
365	+	+	+	+	+	+
366	+	+	+	+	+	+
488	-	+	-	+	+	+
603	+	+	+	+	+	+
716	-	+	+	-	-	-
717	+	+	+	+	-	-
718	-	+	+	+	-	-
720	-	+	+	+	-	-
721	-	+	+	+	+	+
722	+	+	+	+	+	+
723	-	+	+	-	-	-
724	-	+	+	-	-	-
725	+	+	+	+	+	+
892	-	+	+	-	-	-

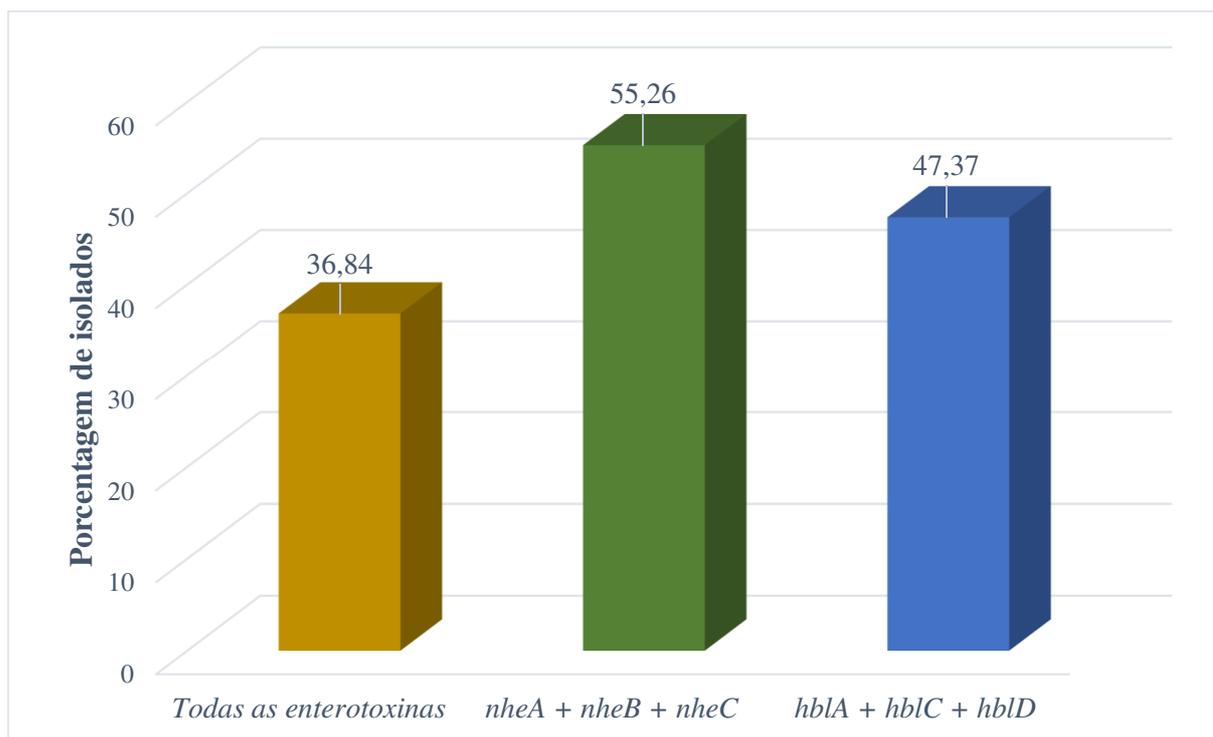
+: presença do gene; -: ausência do gene

Entretanto, para a hemolisina BL (Hbl) apresentar a máxima atividade biológica, deve haver a presença dos 3 componentes dessa enterotoxina. A toxina é composta pelo componente de ligação (componente B) codificado pelo gene *hblA* e duas proteínas líticas (L<sub>1</sub> e L<sub>2</sub>) codificadas pelos genes *hblD* e *hblC*, respectivamente (LINDBACK; GRANUM, 2006).

A enterotoxina não-hemolítica (Nhe), também, é constituída por três proteínas de tamanhos moleculares de 39, 45 e 105 kDa, codificadas pelos genes *nheA*, *nheB* e *nheC*. A atividade biológica máxima também ocorre quando são expressas concomitantemente, apresentando efeito citotóxico com apenas pequenas quantidades da toxina (LUND; GRANUM, 1997). Segundo alguns pesquisadores, a presença de um ou dois componentes do complexo Nhe ou Hbl, já é suficiente para causar a doença diarreica (HWANG; PARK, 2015).

Do total de amostras analisadas, 15 (18,75 %) amostras estavam contaminadas com *B. cereus* em que foram detectados um dos complexos de genes. E entre essas 15 amostras, 9 (11,25 %) estavam contaminadas com o *B. cereus* em que foi detectada os dois complexos de genes.

Dos 38 isolados avaliados, 14 isolados (36,84 %) apresentaram a presença dos seis genes responsáveis pelas duas enterotoxinas, e 21 (52,26 %) e 18 (47,37 %) apresentaram a presença, respectivamente, dos genes do complexo da enterotoxina não-hemolítica e hemolisina BL, conforme apresentados na Figura 4. Resultados similares podem ser observados no estudo de Reis et al. (2013), dos quais foram obtidos 15 isolados de *B. cereus* de leite em pó e 9 deles (60 %) apresentaram a presença do complexo da hemolisina BL. Já Hwang e Park (2015) obtiveram 69 isolados de *B. cereus* a partir de fórmula infantil e 21 isolados continham o complexo de genes *hbl* e 68 continham o complexo de genes *nhe*.



**Figura 4 – Porcentagem de isolados que apresentaram combinação dos genes de enterotoxinas**

No presente estudo foi observada a presença de pelo menos 2 genes de cada enterotoxina em 97,36 % (37/38) dos isolados analisados. Mesmo que os resultados do estudo mostrem que a contagem esteja dentro do padrão, esses isolados apresentam um potencial para causar doença, e provável surto, principalmente quando, após a reconstituição, são expostos em condições inadequadas, favorecendo seu crescimento e produção de toxinas.

### **5.3 Contagem de esporos de bacilos mesófilos aeróbios**

A Tabela 11 descreve o intervalo da contagem de esporos de bacilos mesófilos encontrados em leite em pó de cada marca.

**Tabela 11 – Intervalo de contagem de esporos de bacilos aeróbios mesófilos em leite em pó**

Marca	Contagem (log UFC/g)
A	<1,00 - 1,78
B	2,04 - 2,81
C	<1,00 - 2,32
D	1,48 - 2,43
E	2,11 - 2,92
F	<1,00 - 1,70
G	1,00 - 1,30
H	1,48 - 2,78
I	<1,00 - 1,48
J	<1,00 - 2,11
K	1,60 - 1,95
L	1,84 - 3,81
M	<1,00 - 2,20
N	<1,00 - 2,00

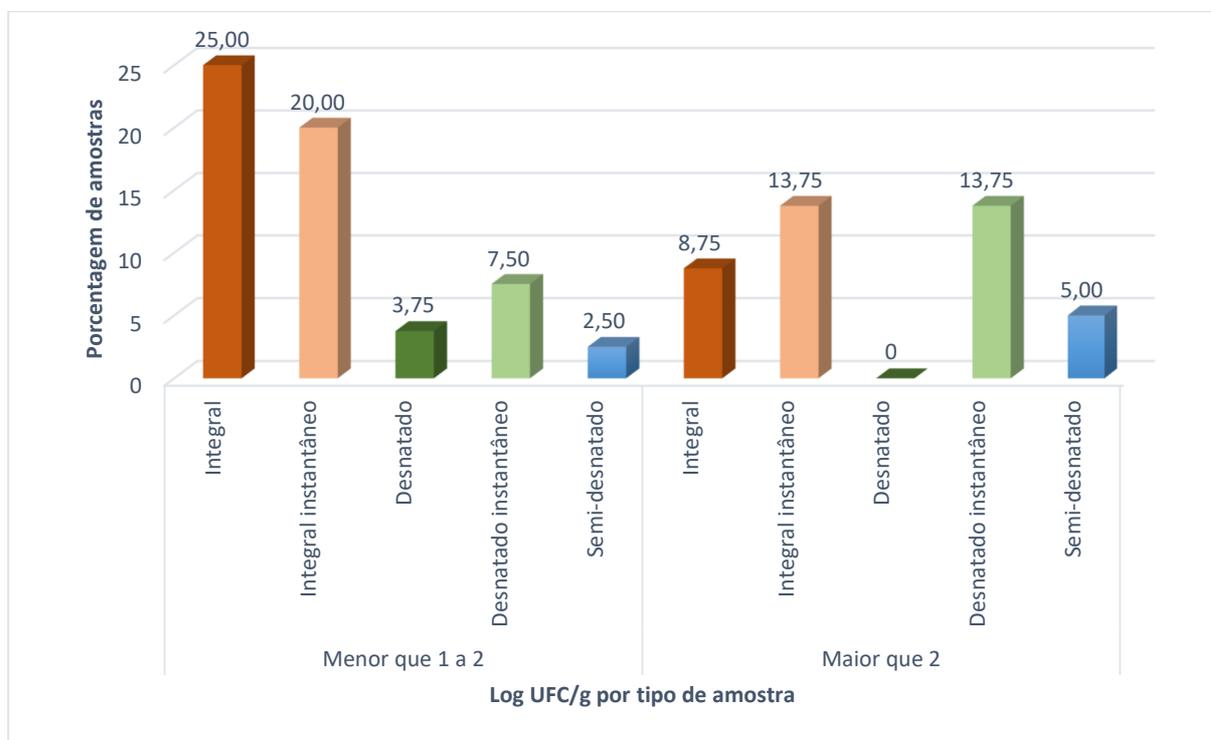
Diante dos resultados, a maior contagem encontrada foi de 3,81 log UFC/g em uma amostra da marca L, porém nenhuma amostra apresentou contagem acima de 4 log UFC/g (Tabela 11). Poucas amostras (9/80) apresentaram contagem menor que 1,00 log UFC/g (limite de detecção do método). Dessa forma, considerando o padrão microbiológico de  $1 \times 10^5$  (5,00 log) UFC/g definido pela Portaria n° 369 regulado pelo MAPA (BRASIL, 1997), podemos dizer que todas as amostras estão dentro do padrão, entretanto essa Portaria regulamenta a contagem de células vegetativas de micro-organismos aeróbios mesófilos estáveis.

Resultados similares podem ser encontrados como apresentado no estudo de Kent et al. (2016), em que as amostras de leite em pó apresentaram uma média de contagem de 2,30 log UFC/g para esporos de bacilos mesófilos.

Em um estudo realizado por Vidal-Martins et al. (2005), 85 amostras (77,3 %) de leite UHT, do total de 110, apresentaram contagem de micro-organismos mesófilos aeróbios facultativos abaixo de 2,00 log UFC/mL e 25 amostras (22,7 %) apresentaram contagem acima de 5,00 log UFC/mL.

No presente trabalho, um grande número de amostras (47/80 = 58,75 %) apresentou uma baixa contaminação, de menor que 1,00 a 2,00 log UFC/g. Também se nota que as amostras do tipo instantâneo estavam mais contaminadas que as outras amostras, o que

pode ser explicado como anteriormente pela presença da lecitina de soja que pode ser um veículo de contaminação, como observado na Figura 5.



**Figura 5 - Distribuição das amostras contaminadas com esporo de bacilo aeróbio mesófilo por tipo de amostra de leite em pó.**

Observa-se que a ocorrência de esporos de bacilo mesófilo em amostras de leite em pó do tipo integral foi maior que a amostras do tipo desnatado. Isso pode ter ocorrido devido à diferença de densidade entre os esporos bacterianos, junto a gordura, e o plasma do leite (WILBEY, 2002; GHODDUSI, OZER; 2015). Na etapa de desnate, pode ter ocorrido o “arraste” dos esporos para a gordura do leite, diminuindo a carga de esporos no leite desnatado. Porém, isso não foi observado nas amostras do tipo desnatado instantâneo em que a prevalência foi maior que do tipo desnatado, devido a adição da lecitina de soja.

Contudo, foram obtidos 293 isolados de bacilos mesófilos, sendo necessária uma posterior identificação desses isolados. Alguns desses isolados obtidos podem ser *B. cereus*, tendo já sido isolados previamente em metodologia específica. Como não foi realizada nenhuma análise para identificar esses isolados, eles também podem pertencer às espécies *B. licheniformis*, *B. pumilus* e *B. subtilis*, que são predominantemente encontrados em leite líquido, como relatado por Scheldeman et al. (2005). Sadiq et al. (2016) também confirmou a presença de *B. licheniformis*, micro-organismo mais prevalente, em amostras de fórmula

infantil, leite em pó desnatado e integral. Além disso, alguns desses isolados também podem ser identificados como *B. amyloliquefaciens*, como no estudo de González et al. (2013).

#### 5.4 Contagem de esporos de bacilos termófilos aeróbios

Na Tabela 12 foi apresentada a distribuição da contagem de esporos de bacilos termófilos nas diferentes marcas de leite em pó analisadas.

**Tabela 12 – Intervalo de contagem de esporos de bacilos aeróbios termófilos em leite em pó**

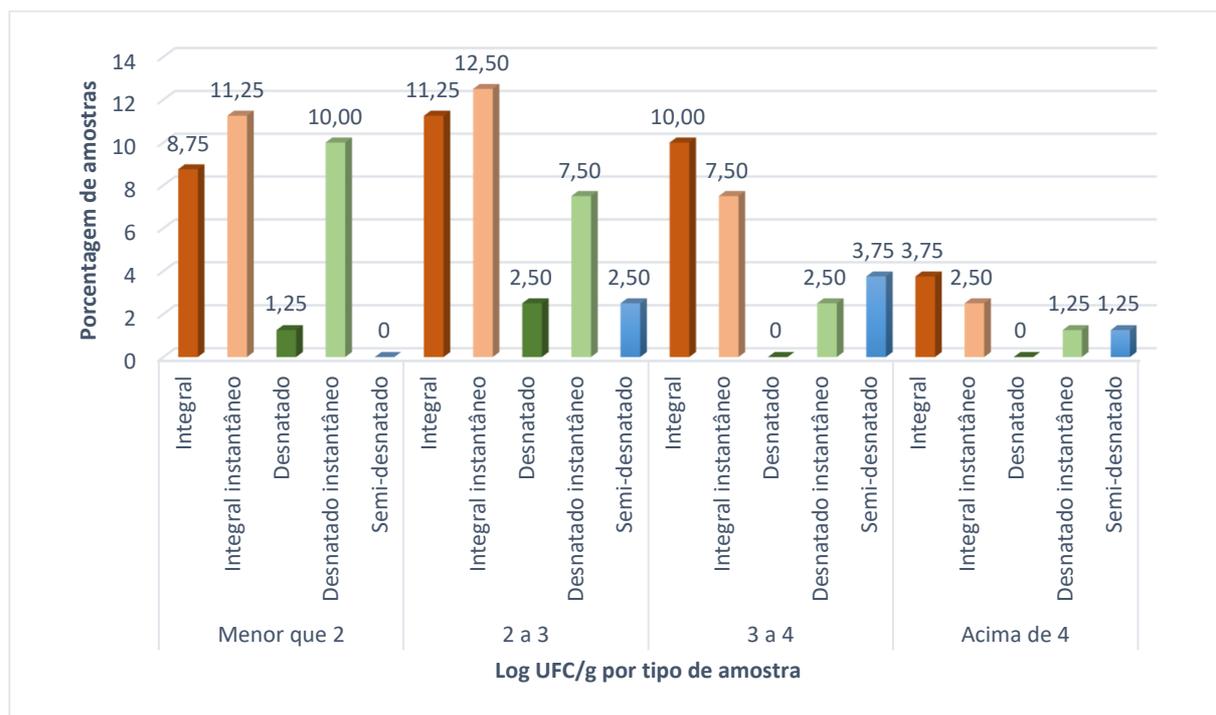
Marca	Contagem (log UFC/g)
A	<2,00 - 4,48
B	<2,00 - 3,76
C	<2,00 - 3,70
D	<2,00 - 3,74
E	2,00 - 5,43
F	<2,00 - 5,10
G	<2,00 - 4,46
H	2,00 - 3,00
I	2,48 - 3,50
J	<2,00 - 2,30
K	<2,00 - 3,32
L	<2,00
M	<2,00 - 2,70
N	<2,00 - 2,78

De modo geral, observa-se que as amostras apresentaram uma alta contagem de esporos de bacilos termófilos entre 4,00 e 5,00 log UFC/g, entretanto, as amostras da marca L apresentaram contagem abaixo do limite de detecção (Tabela 12).

Também, no estudo realizado por Kent et al. (2016), verificou-se resultados similares em que as amostras de leite em pó apresentaram contagem média de 3,40 e 3,20 log UFC/g para esporos de bacilos termófilos e esporos termófilos altamente resistentes ao calor, respectivamente. Para a contagem desses esporos termófilos, os autores utilizaram choque térmico de 80 °C/12 minutos e 100 °C/30 minutos, respectivamente. Além disso, foi realizada a contagem de esporos especificamente termorresistentes e foi encontrado contagem média de 2,50 log UFC/g. Para essa contagem foi realizada um choque de 106 °C por 30 minutos.

Como se observa nos resultados apresentados na Figura 6, a maioria das amostras (55/80) apresentou uma alta contaminação por bacilos termófilos. Tanto as amostras do tipo integral quanto integral instantâneo apresentaram alta contaminação. Uma hipótese é que os materiais lipídicos possuem um efeito protetor aos micro-organismos quando submetidos ao tratamento térmico, como explicado por Ababouch e Busta (1987). Além disso, em uma marca analisada não houve a detecção de bacilos termófilos.

Diante dos resultados apresentados nesse presente estudo, verifica-se que essas altas contagens de esporos de termófilos indicam que a qualidade do leite em pó não está apropriada, podendo resultar na deterioração do produto e derivados e subsequente perda econômica. Dessa forma, há a necessidade de melhoria na higienização dos equipamentos utilizados no processo, removendo assim possíveis biofilmes formados pelas espécies de bacilos.



**Figura 6 - Distribuição das amostras contaminadas com esporo de bacilo aeróbio termófilo por tipo de amostra de leite em pó**

Foi observado que a contagem para esporos de bacilos termófilos foi bem mais alta que para esporos de bacilos mesófilos. Para isso, observa-se a termorresistência dos principais bacilos termófilos encontrados em alimentos, como esporos de *G. stearothermophilus* apresentando um valor D de  $D_{140} = 0,9$  segundos (HUEMER et al., 1998) e para célula vegetativa de *Anoxybacillus flavithermus*, pois não há estudos sobre a

termorresistência de seus esporos, apresentando valor  $D_{70} = 0,69$  minutos (REICH et al., 2017). Já os esporos de bacilos mésofilos, como *B. pumilus* apresenta  $D_{100} = 0,83$  segundos, *B. subtilis* apresenta  $D_{100} = 1,18$  segundos, *B. licheniformis* apresenta  $D_{100} = 2,37$  segundos e *B. megaterium* apresenta  $D_{100} = 2,16$  segundos (JAGANNATH; TSUCHIDO, 2003). Além disso, nas etapas de concentração e secagem, durante o processamento do leite em pó, temperaturas maiores de 100 °C são utilizadas (FERNANDES, 2009; MODI, 2009; ROWE; DONAGHY, 2011).

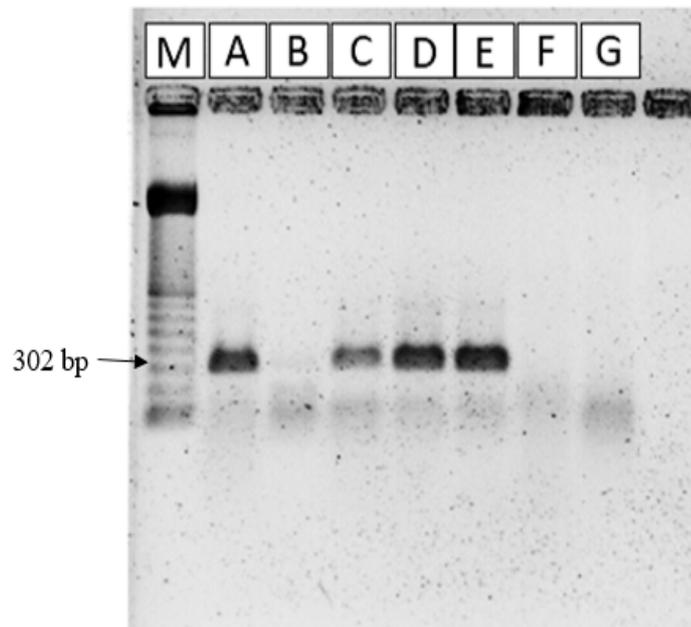
Diante desses dados podemos dizer que as espécies termófilas seriam as mais prevalentes no leite em pó.

Observando os resultados de contagens de esporos de bacilos mesófilos e termófilos, foi verificado que as contagens entre as amostras da mesma marca foram próximas. Isso pode indicar que a contaminação esteja relacionada ao ambiente e a linha de processamento.

Contudo, foram obtidos 222 isolados de bacilos termófilos em que se prosseguiu para a identificação de *G. stearothermophilus* por meio da PCR.

#### **5.4.1 Identificação de *Geobacillus stearothermophilus***

Dentre os 222 isolados de bacilos aeróbios termófilos submetidos à identificação por PCR da região ITS 16-23S do rRNA, 46 foram confirmados como *Geobacillus stearothermophilus*, representando 20,72 % (46/222) do total de isolados. A Figura 7 ilustra a foto do gel de eletroforese do produto da PCR da identificação de *G. stearothermophilus*.



**Figura 7 – Eletroforese em gel de isolados de bacilos termófilos de leite em pó comercial para identificação de *G. stearothermophilus***

M: marcador de peso molecular de 100 bp

A: controle positivo (*G. stearothermophilus* ATCC 7953)

B: controle negativo

C, D e E: isolados positivos para *G. stearothermophilus*

F e G: isolados negativos para *G. stearothermophilus*

Nas amostras da marca “K” e “N”, foi isolada apenas uma cultura e que foi identificada como *G. stearothermophilus*. Na amostra integral da marca “A”, um pouco mais de 90 % dos isolados também foi identificado como *G. stearothermophilus*. As marcas “A”, “K” e “N” foram as que apresentaram maior contaminação com esse micro-organismo. Tais resultados podem ser observados na Tabela 13.

**Tabela 13 - Relação de isolados de bacilos termófilos positivos para *G. stearothermophilus* por tipo de amostra de leite em pó**

Marca	Tipo	Quantidade de isolados	Isolados positivos	Porcentagem (%)
A	Semidesnatado	10	7	70,00
	Integral	11	10	90,91
B	Integral Instantâneo	12	4	33,33
C	Desnatado Instantâneo	3	1	33,33
D	Desnatado Instantâneo	8	4	50,00
	Integral	6	4	66,67
E	Integral Instantâneo	3	1	33,33
G	Integral	26	8	30,77
H	Integral	5	2	40,00
I	Integral Instantâneo	8	2	25,00
K	Integral Instantâneo	1	1	100,00
M	Desnatado	5	1	20,00
N	Integral	1	1	100,00
Total		99	46	46,46

*G. stearothermophilus* foi identificado em 20,00 % (16/80) das amostras e as contagens variaram de 1,34 a 4,30 log UFC/g. A contagem de *G. stearothermophilus* obtida em cada amostra positiva está descrita na Tabela 14. A amostra 2 da marca “A” e a amostra 2 da marca “G” apresentaram as maiores contagens, 4,30 log UFC/g e 4,10 log UFC/g, respectivamente. Apenas a amostra 17 da marca “D” apresentou uma baixa contagem de 1,34 log UFC/g.

**Tabela 14 - Contagem de *G. stearothermophilus* por tipo de amostra de leite em pó**

Marca	Código da Amostra	Tipo	Contagem (log UFC/g)
A	2	Semidesnatado	4,30
	9	Semidesnatado	3,20
	11	Integral	3,37
B	9	Integral Instantâneo	3,30
C	5	Desnatado Instantâneo	3,22
D	3	Desnatado Instantâneo	2,60
	17	Desnatado Instantâneo	1,34
	18	Integral	2,82
E	4	Integral Instantâneo	3,73
G	1	Integral	3,28
	2	Integral	4,10
H	2	Integral	2,60
I	5	Integral Instantâneo	2,90
K	2	Integral Instantâneo	3,00
M	5	Desnatado	2,00
N	2	Integral	2,00

Os 176 isolados que foram negativos para PCR de *G. stearothermophilus*, foram submetidos a um teste de crescimento em caldo TSB a 35 °C por 24 horas, para verificar se esses isolados são capazes de crescer em temperatura de micro-organismos mesófilos. Com isso, 48,30 % (85/176) dos isolados não identificados foram capazes de crescer nessa temperatura. Uma hipótese para explicar esse fato seria que esses isolados são mesófilos, porém são tolerantes a temperatura mais alta conseguindo crescer a temperatura de micro-organismo termófilo (T = 55 °C). Algumas espécies como *B. licheniformis* e espécies do gênero *Paenibacillus* são classificados como micro-organismos termotolerantes ou termofílicos (PHILLIPS; GRIFFITHS, 1986; SCHELDEMAN et al., 2005). Além disso, Ronimus et al. (2003) detectou a presença de *B. subtilis* que também é uma espécie de bacilo mesófilo que pode crescer em temperaturas mais altas, podendo ser um termotolerante.

Os outros 91 (51,70 %) isolados de bacilos termófilos de 176 que não foram identificados como *G. stearothermophilus* e que foram capazes de crescer apenas na temperatura de 55 °C podem pertencer ao gênero *Anoxybacillus*, uma vez que esse micro-organismo também é considerado termófilo. Assim como observado no estudo de Miller et al. (2015), em que *Anoxybacillus* sp. foi o segundo gênero mais encontrado em amostras de leite cru e leite em pó.

Como demonstrado no estudo de Sadiq et al. (2016), foi detectado a presença de *B. licheniformis*, micro-organismo mais prevalente, e também *G. stearothermophilus* e *A. flavithermus* em amostras de fórmula infantil, leite em pó desnatado e integral.

### **5.5 Contagem de esporos de bacilos de alta resistência ao calor**

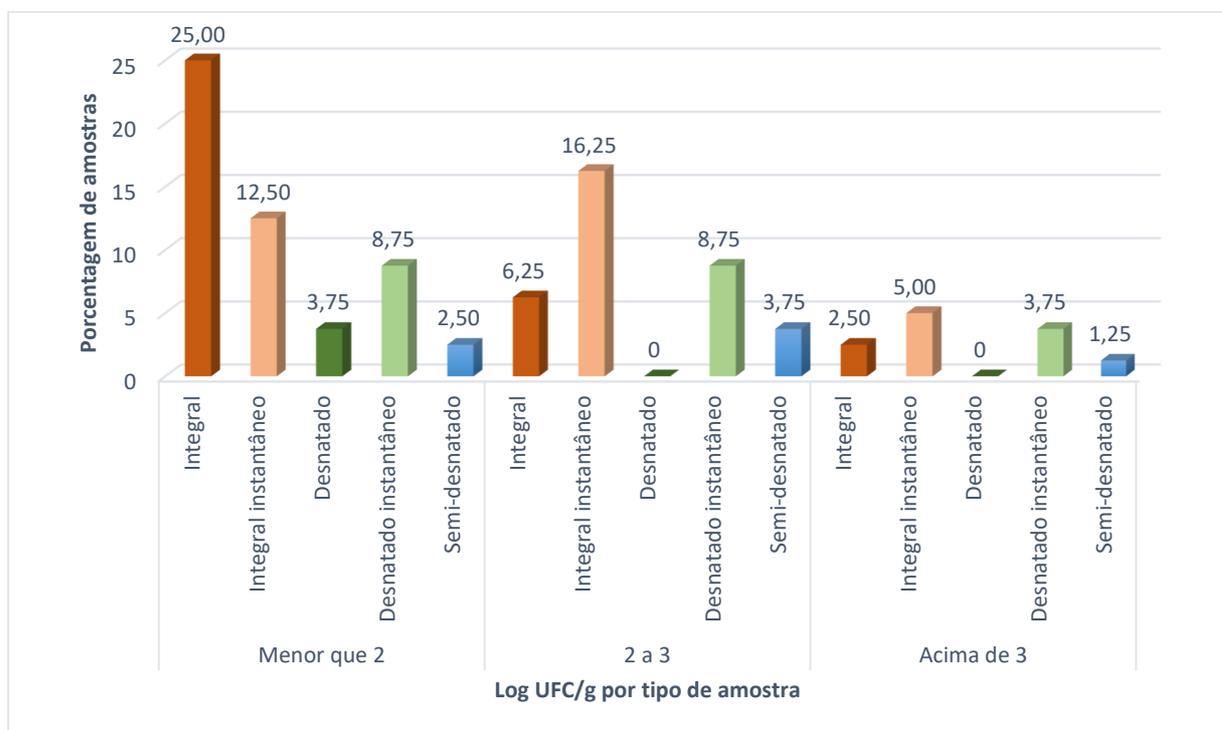
Para essa análise, as 80 amostras foram submetidas ao choque térmico de 100 °C por 30 minutos. Todas as colônias que apresentaram como características morfológicas arredondadas, coloração bege e com uma superfície brilhante e lisa, ou redonda, de coloração amarelo claro e com uma superfície rugosa foram consideradas para a contagem de bacilos que formam esporos altamente resistentes ao calor.

Do total de 80 amostras de leite em pó analisadas, foram observadas que 47,50 % (38/80) das amostras apresentaram contagem acima de 2,00 log UFC/g.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 15, podemos observar a distribuição das contagens de esporos de bacilos de alta resistência ao calor, de acordo com o tipo de leite. As marcas A, C, D e K apresentaram contagens acima de 3,00 log UFC/g. Para as marcas F, G, I, L, M e N, as contagens ficaram abaixo do nível de detecção do método (2,00 log UFC/g).

**Tabela 15 – Intervalo de contagem de esporos de bacilos formadores de esporos de alta resistência ao calor em leite em pó**

Marca	Contagem (log UFC/g)
A	<2,00 - 3,90
B	<2,00 - 2,78
C	<2,00 - 3,00
D	<2,00 - 3,30
E	2,00 - 2,60
F	<2,00
G	<2,00
H	<2,00 - 2,30
I	<2,00
J	<2,00 - 2,30
K	<2,00 - 3,00
L	<2,00
M	<2,00
N	<2,00



**Figura 8 - Distribuição das amostras contaminadas com esporo de bacilo altamente resistente ao calor por tipo de amostra de leite em pó.**

A maioria das amostras apresentou baixa contaminação com contagem abaixo do limite de detecção, como demonstrado na Figura 8. As amostras que apresentaram maior

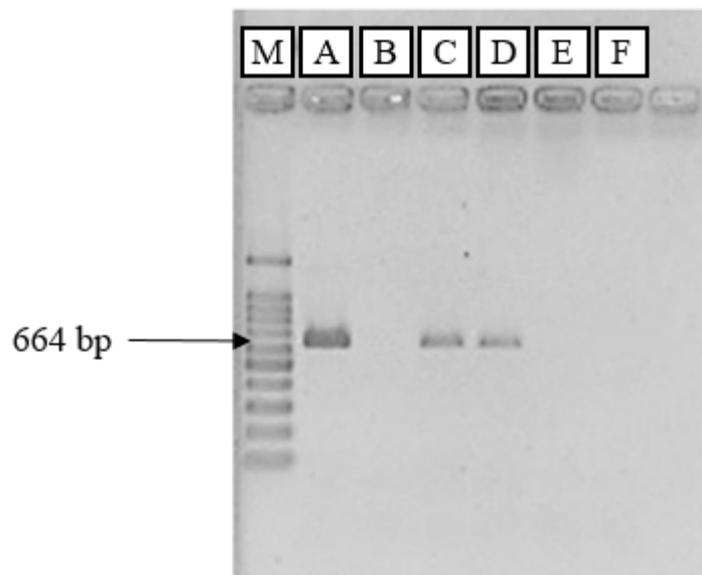
contaminação foram do tipo instantâneo, e como mencionado anteriormente, a gordura do leite pode ter influenciado na sobrevivência do micro-organismo no produto.

Também, foi verificado que as contagens entre as amostras de mesma marca não ficaram próximas entre si, podendo indicar que a contaminação seja proveniente da matéria-prima, ou seja, a qualidade do leite cru influenciou diretamente a qualidade do leite em pó.

Ao todo foram obtidos 60 isolados de esporos resistentes ao calor que foram submetidos à identificação de *B. sporothermodurans* pela técnica da PCR.

### 5.5.1 Identificação de *Bacillus sporothermodurans*

Dos 60 isolados de bacilos formadores de esporos altamente resistentes ao calor obtidos, apenas 2 isolados pertencentes à mesma amostra foram confirmados como *B. sporothermodurans* através da técnica de PCR, representando apenas 3,33 % dos isolados, como pode ser observado na Figura 9:



**Figura 9 - Eletroforese em gel de isolados de bacilos altamente resistente ao calor de leite em pó comercial para identificação de *B. sporothermodurans***

M: marcador de peso molecular de 100 bp

A: controle positivo (*B. sporothermodurans* DSM 10599)

B: controle negativo

C e D: isolados positivos para *B. sporothermodurans*

E e F: isolados negativos para *B. sporothermodurans*

Os dois isolados identificados foram provenientes da mesma amostra da marca “B” do tipo integral. Ou seja, após essa etapa de identificação, a contagem de *B. sporothermodurans* para essa amostra foi de 2,00 log UFC/g.

Baixa ocorrência ( $1/80 = 1,25 \%$ ) com baixa contagem de *B. sporothermodurans* em leite em pó foi observada neste estudo, indicando que esta espécie tem pouca representação na microbiota deteriorante mesófila de leite em pó.

Há escassez de trabalhos com *B. sporothermodurans* em leite em pó no Brasil, entretanto, há mais estudos com leite UHT, como no trabalho realizado por Zacarchenco et al. (2000) que encontrou *B. sporothermodurans* com contagens variando 4,30 a 5,98 log UFC/mL.

Os 58 isolados que apresentaram resultados negativos para a identificação de *B. sporothermodurans*, foram submetidos ao crescimento em caldo BHI suplementado de vitamina B12 1mg/L a 55 °C por 24 horas. Desses isolados, 28 conseguiram crescer nessa temperatura, ou seja, 48,3 % dos isolados negativos para *B. sporothermodurans*. Além disso, esses 28 isolados que demonstraram a capacidade de crescer em temperatura de 55 °C, classificados como mesófilos termotolerantes, foram submetidos à análise de PCR para verificar se seriam *G. stearothermophilus*. Como resultado, verificou-se que os mesmos não são *G. stearothermophilus*, pois esse micro-organismo não é capaz de crescer em temperatura de 35-37 °C.

Tais isolados termotolerantes podem pertencer ao gênero *Paenibacillus*, uma vez que esse micro-organismo também pode produzir esporos altamente resistentes ao calor, como encontrado por Scheldeman et al. (2005).

Há a necessidade de um melhoramento na metodologia para recuperação de células de *B. sporothermodurans* em meio de cultura, como já reportado por Montanari et al. (2004). Como o *B. sporothermodurans* é considerado um micro-organismo deteriorante, sendo relatado em leite UHT (ZACARCHENCO et al., 2000; MONTANARI et al., 2004; BUSATTA et al., 2005), são necessários estudos mais avançados sobre o comportamento dessa bactéria tanto no leite líquido quanto na forma em pó, e sobre o efeito do processamento do leite em pó sobre os esporos de *B. sporothermodurans*.

É necessária uma complementação do estudo com a identificação dos isolados de esporos de bacilos altamente resistentes ao calor ao nível de gênero ou espécie para definir a microbiota e contribuir com a qualidade sanitária do leite em pó.

## 6 CONCLUSÕES

Embora baixas contagens de *B. cereus* tenham sido encontradas nas amostras de leite em pó analisadas, estes apresentaram potencial patogênico devido à presença de genes codificadores das enterotoxinas NHE e HBL, indicando um risco aos consumidores quando estes produtos são expostos em condições propícias para seu desenvolvimento, como a reconstituição e consumo não imediato e exposição à temperatura ambiente por longos períodos, contrariando as recomendações de uso do produto. Também como é utilizado como ingrediente, o leite em pó se torna uma fonte de contaminação para outros produtos, podendo ser um risco à segurança do produto.

Além disso, o principal público-alvo de consumo de leite em pó são as crianças, e a presença desse micro-organismo com grande potencial patogênico é uma preocupação à saúde pública.

Foi possível verificar que a contagem variou entre as amostras da mesma marca em relação a *B. cereus* e esporos de bacilos altamente resistente ao calor. Dessa forma, observou-se que a distribuição da contaminação desses bacilos em leite em pó não é uniforme, e que a qualidade do leite cru influencia diretamente o produto final. Já para o grupo de bacilos mesófilos foi verificado resultado de contagens próximas, podendo dizer que essa contaminação possa ser do ambiente e da linha de processamento.

Altas contagens de esporos de bacilos termófilos foram encontradas e, portanto, é importante ressaltar que a maioria dos micro-organismos termófilos são deteriorantes e a reconstituição desse leite em pó acompanhado de aquecimento pode propiciar a ativação dos esporos, germinação e o desenvolvimento dessas bactérias e uma possível deterioração do produto, deixando-o em condições inadequadas ao consumo. Dessa forma, é necessário o estabelecimento de um padrão de qualidade microbiológica para esse tipo de micro-organismo, uma vez que o leite em pó é muito utilizado como ingrediente para a produção de outros alimentos lácteos, evitando assim a sua deterioração.

Dentro do grupo dos bacilos termófilos, foi observada uma baixa ocorrência de *G. stearothermophilus* nas amostras analisadas, porém com altas contagens. É importante o controle desse micro-organismo, pois é o principal micro-organismo deteriorante de alimentos tratados termicamente.

Uma baixa incidência de *B. sporothermodurans* foi observada nas amostras de leite em pó analisadas, sendo necessários estudos mais aprofundados do comportamento desse

micro-organismo durante o processamento de leite em pó, uma vez que essa bactéria pode ser encontrada em leite fluído.

Dessa forma, é necessário melhorar as condições de higiene e de processamento do leite em pó para garantir a qualidade do produto e dos seus subprodutos e a segurança do consumidor.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABABOUC, L.; BUSTA, F.F. Effect of thermal treatments in oils on bacterial spore survival. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 62, p.491-502, 1987.

ADDIS, M.F.; TANCA, A.; UZZAU, S.; OIKONOMOU, G.; BICALHO, R.C.; MORONI, P. The bovine milk microbiota: insights and perspectives from -omics studies. **Molecular Biosystems**, v. 12, p. 2359-2372, 2016.

ADIGUZEL, A.; OZKAN, H.; BARIS, O.; INAN, K.; GULLUCE, M.; SAHIN, F. Identification and characterization of thermophilic bacteria isolated from hot springs in Turkey. **Journal of Microbiological Methods**, v. 79, p. 321-328, 2009.

ANVISA. **Recolhimento de produto**. Publicado em 25 de junho de 2015. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset\\_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/anvisa-avalia-medidas-para-recolhimento-do-toddynho/219201/pop\\_up?\\_101\\_INSTANCE\\_FXrpx9qY7FbU\\_viewMode=print&\\_101\\_INSTANCE\\_FXrpx9qY7FbU\\_languageId=en\\_US](http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/anvisa-avalia-medidas-para-recolhimento-do-toddynho/219201/pop_up?_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_viewMode=print&_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_languageId=en_US)>. Acesso em: 11 jan. 2017.

AOUADHI, C.; ROUISSI, Z.; MEJRI, S.; MAAROUFI, A. Inactivation of *Bacillus sporothermodurans* spores by nisin and temperature studied by design of experiments in water and milk. **Food Microbiology**, v. 38, p. 270-275, 2014.

ARNESEN, L.P.S.; FAGERLUND, A.; GRANUM, P.E. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 32, p.579-606, 2008.

ARONSON, A.I.; SHAI, Y. Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective: unique features of their mode of action. **FEMS Microbiological Letters**, v. 195, p. 1–8, 2001.

BATT, C.A. *Bacillus - Bacillus cereus*. **Encyclopedia of Food Microbiology**, p. 124-128, 2014.

BEATTIE, S.H.; WILLIAMS, A.G. Detection of toxigenic strains of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. with an improved cytotoxicity assay. **Letters in Applied Microbiology**, v. 28, p. 221–225, 1999.

BENNETT, R.W.; BELAY, N. *Bacillus cereus*. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4 ed. American Public Health Association, 2001. Chap. 32, p. 311-316.

BENNETT, S.D.; WALSH, K.A.; GOULD, L.H. Foodborne disease outbreaks caused by *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* and *Staphylococcus aureus* - United States, 1998-2008. **Clinical Infectious Diseases**, v. 57, p. 425-433, 2013.

BEUCHAT, L.R.; KOMITOPOULOU, E.; BECKERS, H.; BETTS, R.P.; BOURDICHON, F.; FANNING, S.; JOOSTEN, H.M.; KUILE, B.H.T. Low-Water Activity Foods: Increased Concern as Vehicles of Foodborne Pathogens. **Journal of Food Protection**, v. 76, p. 150-172, 2013.

BOOR, K.; FROMM, H. Managing microbial spoilage in the dairy industry. In: BLACKBURN, C.W. **Food spoilage microorganisms**. Cambridge: Woodhead Publishing Ltd, 2006. p. 171-193.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria n. 369, de 04 de setembro de 1997**. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite em Pó. Disponível em: <<http://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/legislacoes/portaria-ma-369-de-04-09-1997,684.html>>. Acesso em: 19 jun. 2017.

BRASIL. ANVISA. **RDC nº12, de 02 de janeiro de 2001**. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC\\_12\\_2001.pdf/15ffddf6-3767-4527-bfac-740a0400829b](http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC_12_2001.pdf/15ffddf6-3767-4527-bfac-740a0400829b)>. Acesso em: 16 mar. 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa n. 40, de 20 de outubro de 2016**. Reconstituição de leite em pó. Disponível em: <<http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=5&data=21/10/2016>>. Acesso em: 19 jun. 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Decreto nº 9013, de 29 de março de 2017**. Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Disponível em: <<http://alimentusconsultoria.com.br/wp-content/uploads/2017/03/DECRETO-N%C2%BA-9.013-DE-29-DE-MAR%C3%87O-DE-2017.pdf>>. Acesso em: 06 ago. 2017.

BURGESS, S.A.; LINDSAY, D.; FLINT, S.H. Thermophilic bacilli and their importance in dairy processing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, p. 215-225, 2010.

BUSATTA, C.; VALDRUGA, E.; CANSIAN, R.L. Ocorrência de *Bacillus sporothermodurans* em leite UAT integral e desnatado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, p. 408-411, 2005.

- CARIC, M.; AKKERMAN, J.C.; MILANOVIC, S.; KENTISH, S.E.; TAMIME, A.Y. Technology of evaporators, membrane processing and dryers. In: TAMIME, A.Y. **Dairy Powders and Concentrated Products**. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd., 2009. p. 99-148.
- CHEN, L.; DANIEL, R.M.; COOLBEAR, T. Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders: a review. **International Dairy Journal**, v. 13, p. 255–275, 2003.
- CHITOV, T.; DISPAN, R.; KASINRERK, W. Incidence and diarrhegenic potential of *Bacillus cereus* in pasteurized milk and cereal products in Thailand. **Journal of Food Safety**, v. 28, p. 467-481, 2008.
- CHRISTIANSSON, A.; BERTILSSON, J.; SVENSSON, B. *Bacillus cereus* spores in raw milk: factors affecting the contamination of milk during the grazing period. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 305-314, 1999.
- CANAL RURAL. **Brasil renova acordo com Argentina para importar leite em pó**. Publicado em 08 de junho de 2016. Disponível em: <<http://www.canalrural.com.br/noticias/leite/brasil-renova-acordo-com-argentina-para-importar-leite-62443>>. Acesso em: 14 ago. 2017.
- CRIELLY, E.M.; LOGAN, N.A.; ANDERTON, A. Studies on the *Bacillus* flora of milk and milk products. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 77, p. 256–263, 1994.
- DEEB, A.M.M.; AL-HAWARY, I.I.; AMAN, I.M.; SHAHINE, D.M.H.A. Bacteriological investigation on milk powder in the Egyptian market with emphasis on its safety. **Global Veterinary**, v. 4, p. 424–433, 2010.
- DI PINTO, A.; BONERBA, E.; BOZZO, G.; CECI, E.; TERIO, V.; TANTILLO, G. Occurrence of potentially enterotoxigenic *Bacillus cereus* in infant milk powder. **European Food Research and Technology**, v. 237, p. 257-9, 2013.
- DURAND, L.; PLANCHON, S.; GUINEBRETIERE, M.H.; CARLIN, F.; REMIZE, F. Genotypic and phenotypic characterization of foodborne *Geobacillus stearothermophilus*. **Food Microbiology**, v. 45, p. 103-110, 2015.
- EHLING-SCHULZ, M.; FRICKER, M.; SCHERER, S. *Bacillus cereus*, the causative agent of an emetic type of food-borne illness. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 48, p. 479–487, 2004.

FAO/WHO. CODEX ALIMENTARIUS. **CODEX STANDARD FOR MILK POWDERS AND CREAM POWDER: CODEX STAN 207-1999**. Disponível em:

<<http://www.codexalimentarius.org/standards/list-of-standards/en/?provide=standards&orderField=fullReference&sort=asc&num1=CODEX>>.

Acesso em: 27 nov. 2015.

FERNANDES, M.S.; FUJIMOTO, G.; SCHNEID, I.; KABUKI, D.Y.; KUAYE, A.Y. Enterotoxigenic profile, antimicrobial susceptibility, and biofilm formation of *Bacillus cereus* isolated from ricotta processing. **International Dairy Journal**, v. 38, p. 16-23, 2014.

FERNANDES, R. Concentrated and Dried Milk Products. In: FERNANDES, R. **Microbiology Handbook: Dairy Products**. Surrey, UK: Leatherhead Food International Ltd., 2009. p. 21-33.

FLINT, S.H.; WARD, L.J.H.; WALKER, K.M.R. Functional grouping of thermophilic *Bacillus* strains using amplification profiles of the 16S–23S internal spacer region. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 24, p. 539–548, 2001.

FRANK, J.F.; YOUSEF, A.E. Tests for groups of microorganisms. In: WEHR, H.M.; FRANK, J.F. **Standard Methods for the Examination of Dairy Products**. 17 ed. American Public Health Association, 2004. Chap. 8, p.239-242.

FURRER, B.; CANDRIAN, U.; HOEFELEIN, C.; LUETHY, J. Detection and identification of *Listeria monocytogenes* in cooked sausage products and in milk by in vitro amplification of haemolysin gene fragments. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 70, p. 372-379, 1991.

GHODDUSI, H.; OZER, B.H. Microbiology of cream, butter, ice cream and related products. In: OZER, B.H.; AKDEMIR-EVRENDILEK, G. **Dairy microbiology and biochemistry: Recent developments**. CRC Press, 2015. p. 245-270.

GONZÁLEZ, M.J.; GORGOROSO, F.; REGINENSI, S.M.; OLIVEIRA, J.A.; BERMÚDEZ, J. Polyphasic identification of closely related *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens* isolates from dairy farms and milk powder. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Science**, v. 5, p. 2326-2331, 2013.

GORSKI, L.; CSORDAS, A. Molecular detection: principles and methods. In: LIU, D. **Molecular detection of foodborne pathogens**. CRC Press, 2010. p. 1-20.

GRIFFITHS, A.J.F.; WESSLER, S.R.; LEWONTIN, R.C.; CARROLL, S.B. **Introdução à genética**. 9. ed., Guanabara Koogan, 2009.

GUINEBRETIERE, M.H.; AUGER, S.; GALLERON, N.; CONTZEN, M.; DE SARRAU, B.; DE BUYSER, M.L.; LAMBERET, G.; FAGERLUND, A.; GRANUM, P.E.; LERECLUS, D.; DE VOS, P.; NGUYEN-THE, C.; SOROKIN, A. *Bacillus cytotoxicus* sp. nov. is a novel thermotolerant species of the *Bacillus cereus* group occasionally associated with food poisoning. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, p. 31-40, 2012.

HAMMER, P.; LEMBKE, F.; SUHREN, G.; HEESCHEN, W. Characterization of a heat resistant mesophilic *Bacillus* species affecting quality of UHT-milk - a preliminary report. **Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte**, v. 47, p. 303-311, 1995.

HANSEN, B.M.; HENDRIKSEN, N.B. Detection of enterotoxic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 185-189, 2001.

HAUGHTON, P.; GARVEY, M.; ROWAN, N.J. Emergence of *Bacillus cereus* as a dominant organism in Irish retailed powdered infant formulae (pif) when reconstituted and stored under abuse conditions. **Journal of Food Safety**, v. 30, p. 814-831, 2010.

HORNSTRA, L.M.; TER BEEK, A.; SMELT, J.P.; KALLEMEIJN, W.W.; BRUL, S. On the origin of heterogeneity in (preservation) resistance of *Bacillus* spores: input for a 'system' analysis approach of bacterial spores outgrowth. **International Journal of Food Microbiology**, v. 134, p. 9-15, 2009.

HUEMER, I.A.; KLIJN, N.; VOGELSANG, H.W.J.; LANGEVELD, L.P.M. Thermal death kinetics of spores of *Bacillus sporothermodurans* isolated from UHT milk. **International Dairy Journal**, v. 8, p. 851-855, 1998.

HWANG, J.; PARK, J. Characteristics of enterotoxin distribution, hemolysis, lecithinase, and starch hydrolysis of *Bacillus cereus* isolated from infant formulas and ready-to-eat foods. **Journal of Dairy Science**, v. 98, p. 1652-1660, 2015.

JAGANNATH, A.; TSUCHIDO, T. Validation of a polynomial regression model: the thermal inactivation of *Bacillus subtilis* spores in milk. **Letters in Applied Microbiology**, v. 37, p. 399-404, 2003.

JAY, J.M. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed., Artmed, 2005. p. 508-515.

JENSON, I. *Bacillus* - Introduction. **Encyclopedia of Food Microbiology**, p. 111-117, 2014.

KALOGRIDOU-VASSILIADOU, D. Biochemical activities of *Bacillus* species isolated from flat sour evaporated milk. **Journal of Dairy Science**, v. 75, p. 2681-2686, 1992.

KARAMAN, A.D.; ALVAREZ, V.B. Microbiology of evaporated, condensed and powdered milk. In: OZER, B. H.; AKDEMIR-EVRENDILEK, G. **Dairy microbiology and biochemistry: recent developments**. Florida: CRC Press, p. 288-304, 2015.

KENT, D.J.; CHAUHAN, K.; BOOR, K.J.; WIEDMANN, M.; MARTIN, N.H. Spore test parameters matter: mesophilic and thermophilic spore counts detected in raw milk and dairy powders differ significantly by test method. **Journal of Dairy Science**, v. 99, p. 5180-5191, 2016.

KOTZEKIDOU, P. *Bacillus* - *Geobacillus stearothermophilus* (Formerly *Bacillus stearothermophilus*). **Encyclopedia of Food Microbiology**, p.129-134, 2014.

LANGER, A.J.; AYERS, T.; GRASS, J.; LYNCH, M.; ANGULO, F.J.; MAHON, B.E. Nonpasteurized Dairy Products, Disease Outbreaks, and State Laws—United States, 1993–2006. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, p. 385-391, 2012.

LECHNER, S.; MAYR, R.; FRANCIS, K.P.; PRUSS, B.M.; KAPLAN, T.; WIESSNER-GUNKEL, E.; STEWART, G.S.; SCHERER, S. *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 48, p. 1373–1382, 1998.

LINDBACK, T.; GRANUM, P.E. Detection and purification of *Bacillus cereus* enterotoxins. In: ADLEY, C.C. **Food-Borne Pathogens: Methods and Protocols**. Humana Press, p. 15-24, 2006.

LOGAN, N.A.; DE VOS, P. Genus I. *Bacillus*. In: DE VOS, P.; GARRITY, G.M.; JONES, D.; KRIEG, N.R.; LUDWIG, W.; RAINEY, F.A.; SCHLEIFER, K.H.; WHITMAN, W.B. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The Firmicutes**. 2. ed. Vol. 3. Springer, 2009. p. 21-127.

LÜCKING, G.; STOECKEL, M.; ATAMER, Z.; HINRICHS, J.; EHLING-SCHULZ, M. Characterization of aerobic spore-forming bacteria associated with industrial dairy processing environments and product spoilage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 166, p. 270–279, 2013.

LUND, T.; GRANUM, P.E. Comparison of biological effect of the two different enterotoxin complexes isolated from three different strains of *Bacillus cereus*. **Microbiology**, v. 143, p. 3329-3336, 1997.

MAGNUSSON, M.; CHRISTIANSSON, A.; SVENSSON, B. *Bacillus cereus* spores during housing of dairy cows: factors affecting contamination of raw milk. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 2745-2754, 2007.

MARTINS, I.M.; KABUKI, D.Y.; KUAYE, A.Y. Determination and characterization of pathogens found in dairy products. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 68, p. 359-365, 2009.

MAY, F.J.; POLKINGHORNE, B.G.; FEARNLEY, E.J. Epidemiology of bacterial toxin-mediated foodborne gastroenteritis outbreaks in Australia, 2001 to 2013. **Communicable Diseases Intelligence**, v. 40, p. 460-469, 2016.

McKINNON, C.H.; ROWLANDS, G.J.; BRAMLEY, A.J. The effect of udder preparation before milking and contamination from de milking plant on bacterial numbers in bulk milk of eight dairy herds. **Journal of Dairy Research**, v. 57, p. 307-318, 1990.

MILLER, R. KENT, D.J.; WATTERSON, M.J.; BOOR, K.J.; MARTIN, N.H.; WIEDMANN, M. Spore populations among bulk tank raw milk and dairy powders are significantly different. **Journal of Dairy Science**, v. 98, p. 8492-8504, 2015.

MOATSOU, G.; MOSCHOPOULOU, E. Microbiology of Raw Milk. In: OZER, B.H.; AKDEMIR-EVRENDILEK, G. **Dairy microbiology and biochemistry: Recent Developments**. CRC Press, p. 1-38, 2015.

MODI, H.A. Concentrated milks, dried milks and dry whey products. In: MODI, H.A. **Dairy Microbiology**. Jaipur, India: Aavishkar Publishers, 2009. p. 45-61.

MONTANARI, G.; BORSARI, A.; CHIAVARI, C.; FERRI, G.; ZAMBONELLI, C.; GRAZIA, L. Morphological and phenotypical characterization of *Bacillus sporothermodurans*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, p. 802-809, 2004.

MOSSEL, D.A.A.; KOOPMAN, M.J.; JONGERIUS, E. Enumeration of *Bacillus cereus* in foods. **Applied Microbiology**, v. 15, p. 650-653, 1967.

MURPHY, P.; LYNCH, D.; KELLY, P. Growth of thermophilic spore forming bacilli in milk during the manufacture of low heat powders. **International Journal of Dairy Technology**, v. 52, p. 45– 50, 1999.

NAZINA, T.N.; TOUROVA, T.P.; POLTARAUS, A.B.; NOVIKOVA, E.V.; GRIGORYAN, A.A.; IVANOVA, A.E. Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 433-446, 2001.

OLSEN, K.E.; SORRELLS, K.M. Thermophilic flat sour sporeformers. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4 ed. American Public Health Association, 2001. Chap. 25, p. 245-248.

OOMES, S.; VAN ZUIJLEN, A.; HEHENKAMP, J.; BRUL, S. The characterization of *Bacillus* spores occurring in the manufacturing of (low acid) canned products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 120, p. 85-94, 2007.

ORGANJI, S.R.; ABULREESH, H.H.; ELBANNA, K.; OSMAN, G.E.H.; KHIDER, M. Occurrence and characterization of toxigenic *Bacillus cereus* in food and infant feces. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 5, p. 515-520, 2015.

PACHECO-SANCHEZ, C.P.; MASSAGUER, P.R. *Bacillus cereus* in Brazilian Ultra High Temperature milk. **Scientia Agricola**, v. 64, p. 152-161, 2007.

PENNACCHIA, C.; BREEUWER, P.; MEYER, R. Development of a Multiplex-PCR assay for the rapid identification of *Geobacillus stearothermophilus* and *Anoxybacillus flavithermus*. **Food Microbiology**, v. 43, p. 41-49, 2014.

PETTERSSON, B.; LEMBKE, F.; HAMMER, P.; STACKEBRANDT, E.E.; PRIEST, F.G. *Bacillus sporothermodurans*, a new species producing highly heat-resistant endospores. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 46, p. 759-764, 1996.

PHILLIPS, J.D.; GRIFFITHS, M.W. Factors contributing to the seasonal variation of *Bacillus* spp. in pasteurized dairy products. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 61, p. 275-285, 1986.

PREVOST, S.; ANDRE, S.; REMIZE, F. PCR Detection of thermophilic spore-forming bacteria involved in canned food spoilage. **Current Microbiology**, v. 61, p. 525-533, 2010.

REICH, C.; WENNING, M.; DETTLING, A.; LUMA, K.E.; SCHERE, S.; HINRICHS, J. Thermal resistance of vegetative thermophilic spore forming bacilli in skim milk isolated from dairy environments. **Food Control**, v. 82, p. 114-120, 2017.

REIS, A.L.S.; MONTANHINI, M.T.M.; BITTENCOURT, J.V.M.; DESTRO, M.T.; BERSOT, L.S. Gene detection and toxin production evaluation of hemolysin BL of *Bacillus cereus* isolated from milk and dairy products marketed in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, p. 1195-1198, 2013.

REYES, A.F. **Avaliação da contaminação por micro-organismos esporulados e indicadores em requeijão cremoso**. 2008. 194 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

REZENDE-LAGO, N.C.M.; ROSSI JR., O.D.; VIDAL-MARTINS, A.M.C.; AMARAL, L.A. Ocorrência de *Bacillus cereus* em leite integral e capacidade enterotoxigênica das cepas isoladas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, p. 1563-1569, 2007.

ROBINSON, R.K.; ITSARANUWAT, P. The microbiology of concentrated and dried milks. In: ROBINSON, R.K. **Dairy microbiology handbook: the microbiology of milk and milk products**. 3. ed. Wiley-Interscience, 2002. p. 175-211.

RONIMUS, R.; PARKER, L.E.; TURNER, N.; POUDEL, S.; RÜCKERT, A.; MORGAN, H.W. A RAPD-based comparison of thermophilic bacilli from milk powders. **International Journal of Food Microbiology**, v. 85, p. 45-61, 2003.

ROWE, M.; DONAGHY, J. Microbiological aspects of dairy ingredients. In: CHANDAN, R.C.; KILARA, A. **Dairy Ingredients for Food Processing**. Iowa, EUA: Blackwell Publishing Ltd., 2011. p. 59-103.

ROZA, C.R. **Caracterização molecular de linhagens de *Bacillus sporothermodurans* isoladas de leite UHT**. 2004. 69 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

RÜCKERT, A.; RONIMUS, R.S.; MORGAN, H.W. A RAPD-based survey of thermophilic bacilli in milk powders from different countries. **International Journal of Food Microbiology**, v. 96, p. 263-272, 2004.

SADIQ, F.A.; LI, Y.; LIU, T.; FLINT, S.; ZHANG, G.; HE, G. A RAPD based study revealing a previously unreported wide range of mesophilic and thermophilic spore formers associated with milk powders in China. **International Journal of Food Microbiology**, v. 217, p. 200-208, 2016.

SALKINOJA-SALONEN, M.S.; VUORIO, R.; ANDERSSON, M.A.; KÄMPFER, P.; ANDERSSON, M.C.; HONKANEN-BUZALSKI, T.; SCOGING, A.C. Toxigenic strains of *Bacillus licheniformis* related to food poisoning. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 4637–4645, 1999.

SCHELDEMAN, P.; HERMAN, L.; GORIS, J.; DE VOS, P.; HEYNDRICKX, M. Polymerase chain reaction identification of *Bacillus sporothermodurans* from dairy sources. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, p. 983-991, 2002.

SCHELDERMAN, P.; PIL, A.; HERMAN, L.; DE VOS, P.; HEYNDRICKX, M. Incidence and diversity of potentially highly heat-resistant spores isolated at dairy farms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 1480–1494, 2005.

SCHELDEMAN, P.; HERMAN, L.; FOSTER, S.; HEYNDRICKX, M. *Bacillus sporothermodurans* and other highly heat-resistant spore formers in milk. **Journal of Applied Microbiology**, v. 101, p. 542-555, 2006.

SCOTT, S.A.; BROOKS, J.D.; RAKONJAC, J.; WALKER, K.M.R.; FLINT, S.H. The formation of thermophilic spores during the manufacture of whole milk powder. **International Journal of Dairy Technology**, v. 60, p. 109–117, 2007.

SKANDERBY, M.; WESTERGAARD, V.; PARTRIDGE, A.; MUIR, D.D. Dried milk products. In: TAMIME, A.Y. **Dairy Powders and Concentrated Products**. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd., 2009. p. 180-234.

STADHOUDERS, J.; HUP, G.; HASSING, F. The conceptions index and indicator organisms discussed on the basis of the bacteriology of spray-dried milk powder. **Netherlands Milk and Dairy Journal**, v. 36, p. 231–260, 1982.

TALLENT, S.M.; RHODEHAMEL, E.J.; HARMON, S.M.; BENNETT, R.W. **Bacteriological Analytical Manual**. Chap. 14 – *Bacillus cereus*. 2012.

TESSEMA, A.; TIBBO, M. **International Center for Agriculture Research in the Dry Areas**. Milk quality control. 2009.

VAEREWIJCK, M.J.M.; DE VOS, P.; LEBBE, L.; SCHELDAMAN, P.; HOSTE, B.; HEYNDRICKX, M. Occurrence of *Bacillus sporothermodurans* and other aerobic spore-forming species in feed concentrate for dairy cattle. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, p. 1074-1084, 2001.

VAN HEDDEGHEM, A.; VLAEMYNCK, G. Sources of contamination of milk with *Bacillus cereus* on the farm and in the factory. **IDF Bulletin**, v. 275, p. 19-22, 1993.

VAN ZUIJLEN, A.; PERIAGO, P.M.; AMÉZQUITA, A.; PALOP, A.; BRUL, S.; FERNÁNDEZ, P.S. Characterization of *Bacillus sporothermodurans* IC4 spores: putative indicator microorganism for optimization of thermal processes in food sterilization. **Food Research International**, v. 43, p. 1895-1901, 2010.

VIDAL, A.M.C.; ROSSI JR., O.D.; ABREU, I.L.; BURGUER, K.P.; CARDOSO, M.V.; GONÇALVES, A.C.S.; ROSSI, G.A.M.; D'ABREU, L.F. Detection of *Bacillus cereus* isolated during ultra-high temperature milk production flowchart through random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction. **Ciência Rural**, v. 46, p. 286-292, 2016.

VIDAL-MARTINS, A.M.C.; ROSSI JUNIOR, O.D.; REZENDE-LAGO, N.C. Microrganismos heterotróficos mesófilos e bactérias do grupo do *Bacillus cereus* em leite integral submetido a ultra alta temperatura. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, p. 396-400, 2005.

VITTORI, J.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; POIATTI, M.L.; PIGATTO, C.P.; CHIODA, T.P.; RIBEIRO, C.A.M.; GARCIA, G.R.; RAGAZANI, A.V.F. Qualidade microbiológica de leite UHT caprino: pesquisa de bactérias dos gêneros *Staphylococcus*, *Bacillus* e *Clostridium*. **Ciência Rural**, v. 38, p. 761-765, 2008.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J.T.M.; GEURTS, T.J. **Dairy Science and Technology**. 2 ed. CRC Press: New York, USA, 2006. p. 513-535.

WANG, M.; CAO, B.; GAO, Q.; SUN, Y.; LIU, P.; FENG, L.; WANG, L. Detection of *Enterobacter sakazakii* and other pathogens associated with infant formula powder by use of a DNA microarray. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, p. 3178-3184, 2009.

WATTERSON, M.J.; KENT, D.J.; BOOR, K.J.; WIEDMANN, M.; MARTIN, N.H. Evaluation of dairy powder products implicates thermophilic sporeformers as the primary organisms of interest. **Journal of Dairy Science**, v. 97, p. 2487-2497, 2014.

WILBEY, R.A. Microbiology of cream and butter. In: ROBINSON, R. K. **Dairy microbiology handbook: The microbiology of milk and milk products**. 3. ed. Wiley-interscience, 2002. p. 123-174.

YOO, J.G.; CHANG, J.H.; KIM, S.Y.; JI, J.Y.; HONG, S.W.; PARK, B.Y.; OH, M.H. Analysis of emetic toxin production by *Bacillus* species using cellular cytotoxicity, molecular, and chromatographic assays. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 19, p. 978–983, 2014.

YOUNG, W.; HINE, B.C.; WALLACE, O.A.M.; CALLAGHAN, M.; BIBILONI, R. Transfer of intestinal bacterial components to mammary secretions in the cow. **PeerJ**, v. 3, p. 14-30, 2015.

YUAN, D.D.; LIU, G.C.; REN, D.Y.; ZHANG, D.; ZHAO, L.; KAN, C.P.; YANG, Y.Z.; MAA, W.; LI, Y.; ZHANG, L.B. A survey on occurrence of thermophilic bacilli in commercial milk powders in China. **Food Control**, v. 25, p. 752-757, 2012.

ZACARCHENCO, P.B.; LEITÃO, M.F.F.; DESTRO, M.T.; ANDRIGHETO, C. Ocorrência de *Bacillus sporothermodurans* em leite UAT/UHT brasileiro e a influência do tratamento térmico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 20, p. 363-368, 2000.

## 8 APÊNDICES

APÊNDICE A – Quantidade de amostras de leite em pó analisadas por tipo e por marca

<b>MARCA</b>	<b>TIPO</b>	<b>QUANTIDADE</b>
A	INTEGRAL INSTANTÂNEO	4
	INTEGRAL	4
	SEMIDESNATADO	2
B	INTEGRAL INSTANTÂNEO	4
	INTEGRAL	2
	SEMIDESNATADO	2
	DESNATADO INSTANTÂNEO	2
C	DESNATADO INSTANTÂNEO	4
D	INTEGRAL INSTANTÂNEO	7
	INTEGRAL	4
	SEMIDESNATADO	2
	DESNATADO INSTANTÂNEO	5
E	INTEGRAL INSTANTÂNEO	2
	DESNATADO INSTANTÂNEO	3
F	INTEGRAL	3
G	INTEGRAL	3
H	INTEGRAL	3
I	INTEGRAL INSTANTÂNEO	3
	INTEGRAL	2
J	INTEGRAL INSTANTÂNEO	4
K	INTEGRAL INSTANTÂNEO	3
L	DESNATADO INSTANTÂNEO	3
M	INTEGRAL	3
	DESNATADO	3
N	INTEGRAL	3

APÊNDICE B – Descrição dos isolados de *Bacillus cereus* de amostras de leite em pó

AMOSTRA	NUMERAÇÃO DO ISOLADO	CÓDIGO DO ISOLADO	RESULTADO
B8	603	B8.1CVG	<i>Bacillus cereus</i>
D2	107	D2.1CVG	<i>Bacillus cereus</i>
D3	108	D3.1CVG	<i>Bacillus cereus</i>
D5	176	D5.1CVG	<i>Bacillus cereus</i>
D5	177	D5.2CVG	<i>Bacillus cereus</i>
D9	297	D9.1CVG	<i>Bacillus cereus</i>
D9	298	D9.2CVG	<i>Bacillus cereus</i>
D9	300	D9.4CVG	<i>Bacillus cereus</i>
D9	317	D9.1CE	<i>Bacillus cereus</i>
D11	352	D11.1CVG	<i>Bacillus cereus</i>
D12	353	D12.1CVG	ND
D13	354	D13.1CVG	<i>Bacillus cereus</i>
D13	355	D13.2CVG	ND
D13	356	D13.3CVG	<i>Bacillus cereus</i>
D13	357	D13.4CVG	<i>Bacillus cereus</i>
D13	358	D13.5CVG	<i>Bacillus cereus</i>
D13	359	D13.6CVG	ND
D14	360	D14.1CVG	<i>Bacillus cereus</i>
D13	361	D13.1CE	<i>Bacillus cereus</i>
D13	362	D13.2CE	<i>Bacillus cereus</i>
D13	363	D13.3CE	<i>Bacillus cereus</i>
D13	364	D13.4CE	<i>Bacillus cereus</i>
D13	365	D13.5CE	<i>Bacillus cereus</i>
D13	366	D13.6CE	<i>Bacillus cereus</i>
D17	487	D17.1CVG	ND
D17	488	D17.2CVG	<i>Bacillus cereus</i>
E2	106	E2.2CVG	<i>Bacillus cereus</i>
E1	111	E1.2CE	ND
F2	307	F2.1CVG	<i>Bacillus cereus</i>
F3	720	F3.1CVG	<i>Bacillus cereus</i>
H2	604	H2.1CVG	ND
H3	716	H3.1CVG	<i>Bacillus cereus</i>
H3	717	H3.2CVG	<i>Bacillus cereus</i>
H3	718	H3.3CVG	<i>Bacillus cereus</i>
J1	16	J1.1CVG	<i>Bacillus cereus</i>
J1	18	J1.3CVG	ND
J1	19	J1.4CVG	<i>Bacillus cereus</i>
K1	173	K1.1CVG	<i>Bacillus cereus</i>
K1	174	K1.2CVG	<i>Bacillus cereus</i>
L2	605	L2.1CVG	ND
L3	725	L3.1CE	<i>Bacillus cereus</i>

M4	719	M4.1CVG	ND
M6	892	M6.1CVG	<i>Bacillus cereus</i>
M6	893	M6.2CVG	ND
N2	721	N2.1CVG	<i>Bacillus cereus</i>
N3	722	N3.1CVG	<i>Bacillus cereus</i>
N1	723	N1.1CE	<i>Bacillus cereus</i>
N2	724	N2.1CE	<i>Bacillus cereus</i>

ND = não identificado

APÊNDICE C – Descrição dos isolados de esporos de bacilos aeróbios termófilos de amostras de leite em pó

AMOSTRA	NUMERAÇÃO DO ISOLADO	CÓDIGO DO ISOLADO	RESULTADO
A2	81	A2.1T	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
A2	83	A2.3T	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
A2	84	A2.4T	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
A2	86	A2.6T	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
A2	89	A2.9T	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
A2	90	A2.10T	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
A9	567	A9.1T	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
A11	863	A11.2T	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
A11	864	A11.3T	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
A11	865	A11.4T	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
A11	866	A11.5T	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
A11	867	A11.6T	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
A11	868	A11.7T	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
A11	869	A11.8T	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
A11	870	A11.9T	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
A11	871	A11.10T	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
A11	872	A11.11T	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
B1	1	B1.1T	ND
B1	2	B1.2T	ND
B1	3	B1.3T	ND
B1	4	B1.4T	ND
B1	5	B1.5T	ND
B2	271	B2.1T	ND
B2	272	B2.2T	ND
B2	274	B2.4T	ND
B3	432	B3.1T	ND
B3	434	B3.3T	ND
B4	560	B4.1T	ND
B5	562	B5.1T	ND
B5	563	B5.2T	ND
B5	564	B5.3T	ND
B5	565	B5.4T	ND
B5	566	B5.5T	ND
B6	607	B6.2T	ND
B6	608	B6.3T	ND
B7	610	B7.1T	ND
B7	611	B7.2T	ND
B8	613	B8.1T	ND
B8	615	B8.3T	ND
B8	617	B8.5T	ND
B9	757	B9.1T	ND
B9	758	B9.2T	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
B9	759	B9.3T	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>

B9	760	B9.4T	ND
B9	761	B9.5T	ND
B9	762	B9.6T	ND
B9	763	B9.7T	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
B9	764	B9.8T	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
B9	765	B9.9T	ND
B9	766	B9.10T	ND
B9	767	B9.11T	ND
B9	768	B9.12T	ND
B10	769	B10.1T	ND
C3	287	C3.1T	ND
C3	288	C3.2T	ND
C4	576	C4.2T	ND
C5	583	C5.7T	ND
C5	584	C5.8T	ND
C5	586	C5.10T	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
D2	91	D2.1T	ND
D2	92	D2.2T	ND
D2	93	D2.3T	ND
D2	94	D2.4T	ND
D2	95	D2.5T	ND
D2	96	D2.6T	ND
D2	97	D2.7T	ND
D2	98	D2.8T	ND
D2	99	D2.9T	ND
D2	100	D2.10T	ND
D3	102	D3.2T	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
D3	103	D3.3T	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
D3	104	D3.4T	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
D4	211	D4.2T	ND
D4	212	D4.3T	ND
D4	213	D4.4T	ND
D4	214	D4.5T	ND
D4	215	D4.6T	ND
D6	275	D6.1T	ND
D6	276	D6.2T	ND
D8	277	D8.1T	ND
D8	278	D8.2T	ND
D9	279	D9.1T	ND
D9	280	D9.2T	ND
D11	449	D11.1T	ND
D11	450	D11.2T	ND
D11	454	D11.6T	ND
D12	455	D12.1T	ND
D12	456	D12.2T	ND
D12	457	D12.3T	ND

D12	460	D12.6T	ND
D13	463	D13.3T	ND
D13	464	D13.4T	ND
D13	467	D13.7T	ND
D13	468	D13.8T	ND
D14	469	D14.1T	ND
D14	470	D14.2T	ND
D14	471	D14.3T	ND
D15	588	D15.2T	ND
D15	589	D15.3T	ND
D15	590	D15.4T	ND
D16	592	D16.1T	ND
D16	597	D16.6T	ND
D17	598	D17.1T	ND
D17	599	D17.2T	ND
D17	600	D17.3T	ND
D17	601	D174T	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
D17	602	D17.5T	ND
D18	770	D18.1T	ND
D18	771	D18.2T	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
D18	772	D18.3T	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
D18	773	D18.4T	ND
D18	776	D18.7T	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
D18	777	D18.8T	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
E1	75	E1.1T	ND
E2	76	E2.1T	ND
E3	281	E3.1T	ND
E3	282	E3.2T	ND
E3	283	E3.3T	ND
E3	284	E3.4T	ND
E3	285	E3.5T	ND
E3	286	E3.6T	ND
E4	630	E4.1T	ND
E4	632	E4.3T	ND
E4	639	E4.10T	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
E5	640	E5.1T	ND
F1	67	F1.3T	ND
F1	70	F1.6T	ND
F1	71	F1.7T	ND
F1	72	F1.8T	ND
F1	74	F1.10T	ND
F2	289	F2.1T	ND
F2	290	F2.2T	ND
F3	741	F3.1T	ND
F3	742	F3.2T	ND
F3	743	F3.3T	ND

F3	744	F3.4T	ND
F3	745	F3.5T	ND
F3	746	F3.6T	ND
F3	747	F3.7T	ND
F3	748	F3.8T	ND
F3	749	F3.9T	ND
F3	750	F3.10T	ND
F3	751	F3.11T	ND
F3	752	F3.12T	ND
G1	200	G1.1T	ND
G1	201	G1.2T	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
G1	202	G1.3T	ND
G1	203	G1.4T	ND
G1	204	G1.5T	ND
G1	205	G1.6T	ND
G1	206	G1.7T	ND
G1	207	G1.8T	ND
G1	208	G1.9T	ND
G1	209	G1.10T	ND
G2	837	G2.1T	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
G2	838	G2.2T	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
G2	839	G2.3T	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
G2	843	G2.7T	ND
G2	844	G2.8T	ND
G2	845	G2.9T	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
G2	847	G2.11T	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
G2	848	G2.12T	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
G2	849	G2.13T	ND
G2	850	G2.14T	ND
G2	851	G2.15T	ND
G2	852	G2.16T	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
G2	853	G2.17T	ND
G2	854	G2.18T	ND
G2	855	G2.19T	ND
G2	856	G2.20T	ND
H1	189	H1.1T	ND
H2	641	H2.1T	ND
H2	642	H2.2T	ND
H2	644	H2.4T	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
H2	646	H2.6T	ND
H2	647	H2.7T	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
H3	730	H3.1T	ND
H3	731	H3.2T	ND
H3	732	H3.3T	ND
H3	733	H3.4T	ND
H3	734	H3.5T	ND

I1	47	I1.1T	ND
I1	48	I1.2T	ND
I1	49	I1.3T	ND
I2	477	I2.6T	ND
I4	619	I4.2T	ND
I4	620	I4.3T	ND
I4	621	I4.4T	ND
I5	622	I5.1T	ND
I5	623	I5.2T	ND
I5	624	I5.3T	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
I5	625	I5.4T	ND
I5	626	I5.5T	ND
I5	627	I5.6T	ND
I5	628	I5.7T	ND
I5	629	I5.8T	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
J2	648	J2.1T	ND
J3	755	J3.1T	ND
J3	756	J3.2T	ND
K1	190	K1.1T	ND
K1	191	K1.2T	ND
K1	192	K1.3T	ND
K1	193	K1.4T	ND
K1	194	K1.5T	ND
K2	873	K2.1T	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
M3	753	M3.1T	ND
M5	857	M5.1T	ND
C55	858	M5.2T	ND
M5	859	M5.3T	ND
M5	860	M5.4T	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
M5	861	M5.5T	ND
N2	735	N2.1T	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
N3	736	N3.1T	ND
N3	738	N3.3T	ND
N3	739	N3.4T	ND
N3	740	N3.5T	ND

ND = não identificado

APÊNDICE D – Descrição dos isolados de esporos de bacilos altamente resistentes ao calor de amostras de leite em pó

AMOSTRA	NUMERAÇÃO DO ISOLADO	CÓDIGO DO ISOLADO	RESULTADO
A3	171	A3.1S	ND
A9	491	A9.1S	ND
A10	492	A10.1S	ND
A10	493	A10.2S	ND
A10	494	A10.3S	ND
A10	495	A10.4S	ND
A10	496	A10.5S	ND
A10	497	A10.6S	ND
B1	43	B1.3S	ND
B1	44	B1.4S	ND
B1	45	B1.5S	ND
B2	261	B2.2S	ND
B2	262	B2.3S	ND
B2	263	B2.4S	ND
B2	264	B2.5S	ND
B3	367	B3.1S	ND
B4	489	B4.1S	<i>Bacillus sporothermodurans</i>
B4	490	B4.2S	<i>Bacillus sporothermodurans</i>
B6	707	B6.1S	ND
B8	709	B8.1S	ND
B9	727	B9.1S	ND
B10	728	B10.1S	ND
C1	46	C1.1S	ND
C4	498	C4.1S	ND
C4	499	C4.2S	ND
C4	500	C4.3S	ND
D1	39	D1.1S	ND
D4	172	D4.1S	ND
D6	265	D6.1S	ND
D8	266	D8.1S	ND
D9	267	D9.1S	ND
D11	368	D11.1S	ND
D12	369	D12.1S	ND
D13	370	D13.1S	ND
D14	371	D14.1S	ND
D15	501	D15.1S	ND
D15	502	D15.2S	ND
D16	503	D16.1S	ND
D16	504	D16.2S	ND
D16	505	D16.3S	ND
D17	506	D17.1S	ND
D17	507	D17.2S	ND
D17	508	D17.3S	ND

D18	729	D18.1S	ND
E1	125	E1.1S	ND
E2	126	E2.1S	ND
E2	127	E2.2S	ND
E2	128	E2.3S	ND
E2	129	E2.4S	ND
E3	269	E3.2S	ND
E3	270	E3.3S	ND
E4	710	E4.1S	ND
E5	712	E5.2S	ND
H2	713	H2.1S	ND
H2	714	H2.2S	ND
J4	726	J4.1S	ND
K2	833	K2.1S	ND
K2	834	K2.2S	ND
K2	835	K2.3S	ND
K3	836	K3.1S	ND

ND = não identificado