



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

ALEXANDRA AYSHA ISABEL ALVA CHINCHA

“DIVERSIDADE FENOTÍPICA, GENOTÍPICA E RESISTOMA DE BACTÉRIAS
FORMADORAS DE ESPOROS MESÓFILAS ISOLADAS DE OVO LÍQUIDO
PASTEURIZADO”

CAMPINAS

2021

ALEXANDRA AYSHA ISABEL ALVA CHINCHA

“Diversidade fenotípica, genotípica e resistoma de bactérias formadoras de esporos mesófilas isoladas de ovo líquido pasteurizado”

Dissertação apresentada à Faculdade da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do Título de Mestra em Ciência de Alimentos

Orientador: **Prof. Dr. Anderson de Souza Sant'Ana**

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA
ALUNA ALEXANDRA AYSHA ISABEL ALVA
CHINCHA E ORIENTADA PELO PROF. DR.
ANDERSON DE SOUZA SANT'ANA.

CAMPINAS

2021

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

AL85d Alva Chinchá, Alexandra Aysha Isabel, 1993-
Diversidade fenotípica, genotípica e resistoma de bactérias formadoras de esporos mesófilas isoladas de ovo líquido pasteurizado / Alexandra Aysha Isabel Alva Chinchá. – Campinas, SP : [s.n.], 2021.

Orientador: Anderson de Souza Sant'Ana.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Esporos. 2. Resistência ao calor. I. Sant'Ana, Anderson de Souza. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Diversidade fenotípica, genotípica e resistoma de bactérias formadoras de esporos mesófilas isoladas de ovo líquido pasteurizado

Palavras-chave em inglês:

Spores

Heat resistance

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Mestra em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Anderson de Souza Sant'Ana [Orientador]

Janaina dos Santos Nascimento

Karen Signori Pereira

Data de defesa: 22-04-2021

Programa de Pós-Graduação: Ciência de Alimentos

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-4537-3236>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/2228275822628130>

COMISSÃO EXAMINADORA

Dr. Anderson de Souza Sant'Ana (Orientador)

Universidade Estadual de Campinas

Orientador

Profa. Dra. Janaina dos Santos Nascimento

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro

Titular

Profa. Dra. Karen Signori Pereira

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Titular

A ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de fluxo de Dissertação e na Secretaria do Programa da Unidade

DEDICATORIA

*A Deus, meu pai celestial, aquele que me
acompanhae sempre me levanta de meus tropeços,
creador de meus pais e das pessoas que mais amo,
com meu mais sincero amor.*

AGRADECIMENTOS

A meus pais, meu irmão e meus avós, por o apoio incondicional no decorrer da realização do mestrado.

Meus mais sinceros agradecimentos ao Prof. Dr. Anderson de Souza Sant'Ana, por me ter dado a oportunidade e confiança para começar a vida acadêmica sob sua orientação.

Aos amigos que fiz no Laboratório de Microbiologia de Alimentos, que me brindaram sempre as melhores condições, e que me permitiram passar momentos inesquecíveis, tanto em atividades acadêmicas como sociais.

Ao Laboratório de Gênômica e BioEnergia (IB - UNICAMP), especialmente para o prof. Dr. Marcelo Carazzolle e a pesquisadora Marina Marone pela colaboração na parte das análises do genoma.

A todas as pessoas que aportaram substancialmente durante todo o mestrado; pelo carinho, companheirismo e parceria em especial para o Gabriel, Yanet, Hector, Arthur e o Antonio.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

RESUMO

Os esporos bacterianos são estruturas excepcionalmente resistentes a condições extremas, e a sua persistência na cadeia produtiva dos alimentos representa uma preocupação constante para este setor econômico. *Bacillus* é o gênero mais destacado, devido à abrangência de sua atividade enzimática e à existência de cepas toxigênicas. Com tudo isso, a proliferação de bactérias formadoras de esporos no produto final em alimentos sensíveis ao calor pode gerar perdas econômicas e problemas na saúde no consumidor. Este trabalho teve como objetivo caracterizar fenotípica e geneticamente o potencial de resistência ao calor dos esporos e a diversidade genética de bactérias mesófilas formadoras de esporos isoladas de ovo líquido pasteurizado. A caracterização fenotípica e genética do potencial da resistência ao calor das bactérias formadoras de esporos foi determinada mediante choques térmicos sucessivos (80°C/30min, 90°C/10 min., 100°C/5 min. e 110°C/5 min.), bem como a amplificação parcial dos genes *spoVAD*, *dacB*, *clpC*, *dnaK* e *yitF* (Tn1546), respectivamente. As vias metabólicas envolvidas na resistência a altas temperaturas foram recuperadas em alguns isolados a través do *Whole Genome Sequencing*. Por outro lado, a identificação dos isolados foi feita através da amplificação parcial do gene 16S RNA ribossômico seguido das análises filogenéticas. A diversidade genética das bactérias mesófilas formadoras de esporos foi determinada mediante técnicas de tipagem molecular (RAPD), ou seja, a comunidade estudada estava dominada, principalmente, por isolados pertencentes ao gênero de *Bacillus* (86%), seguido por *Brevibacillus* (10%) e *Lysinibacillus* (4%). Nos testes fenotípicos, as condições de 80°C/30 min. (24%) e 90°C/10 min. (33%) resultaram em uma menor redução da população isolada da matéria-prima. No entanto, a redução na matéria-prima (73 e 93%) e no produto final (73 e 96%) foi similar a 100°C/5 min. e 110°C/5 min. O gene *dnaK* apresenta correlação positiva com a maior condição térmica (110°C/5min.), mas a condição térmica com o maior número de genes correlacionados positivamente (*clpC*, *cdnL*, *yitF* [Tn1546] e *spoVAD*) é 100°C/5 min. Uma análise da diversidade genética foi realizada entre as bactérias resistentes a diferentes choques térmicos, encontrando-se uma complexa diversidade. O genoma de 4 cepas foi sequenciado, tendo sido encontrados genes da esporulação relacionados à formação da estrutura, estágios da esporulação, iniciação e regulação, proteínas específicas da esporulação e germinação, fatores sigma e fatores transcricionais, genes das células vegetativas relacionadas à indução por dano, resposta ao estresse, estresse geral e reparação do DNA. A maioria das bactérias que compõem a comunidade isolada a partir de amostras de matéria-prima e produto final de ovo líquido pasteurizado possuem características relacionadas ao potencial de resistência ao calor baseado nos ensaios fenotípicos e genotípicos.

ABSTRACT

Bacterial spores are extremely resistant structures under extreme conditions. Its persistence in the food production chain is a frequent concern for this economic sector. *Bacillus* is the most outstanding, due to its comprehensive enzymatic activity and the existence of toxigenic strains. As a result, the proliferation of spore-forming bacteria in the final product in heat-sensitive foods can generate economic losses and health problems for the consumer. The objective of this work was to characterize phenotypically and genetically the potential of heat resistance of spores and to characterize the genetic diversity of mesophilic bacteria that form spores isolated from pasteurized liquid egg. The phenotypic and genetic characterization of the heat resistance potential was determined by successive thermal shocks (80 ° C for 30 min, 90 ° C for 10 min., 100 ° C for 5 min. And 100 ° C for 5 min) and by means of the partial amplification of the *spoVAD*, *dacB*, *clpC*, *dnaK* and *yitF* (Tn1546) genes, respectively. Likewise, the metabolic pathways involved in resistance to high temperatures were recovered in some isolates using Whole Genome Sequencing. On the other hand, the identification of the isolates was carried out through partial amplification of the 16s ribosomal RNA gene followed by phylogenetic analyzes. The genetic diversity of the spore-forming mesophilic bacteria was determined using molecular typing techniques (RAPD). The studied community was mainly dominated by isolates belonging to the genus of *Bacillus* (86%), followed by *Brevibacillus* (10%) and *Lysinibacillus* (4%). In phenotypic tests, the greatest reduction in isolates was at 80 ° C / 30 min. (24%) and 90 ° C / 10min. (33%) in the raw material; however, the reduction in raw material (73 and 93%) and final product (73 and 96%) were similar to 100 ° C / 5 min. and 110 ° C / 5 min. The *dnaK* gene has a positive correlation with the highest thermal condition (110 ° C / 5min.); however, the thermal condition with the highest number of positively correlated genes (*clpC*, *cdnL*, *yitF* [Tn1546]) and *spoVAD*) is 100 ° C/5 min. An analysis of genetic diversity was carried out between bacteria resistant to different thermal shocks, finding a complex diversity. The genome of 4 strains was sequenced and sporulation genes related to structure formation, sporulation stages, initiation and regulation, specific sporulation and germination proteins, sigma factors and transcriptional factors were found. Also, vegetative cell genes related to damage induction, stress response, general stress and DNA repair. Most of the bacteria that make up the community isolated from samples of raw material and pasteurized liquid egg final product have characteristics related to the potential for heat resistance based on phenotypic and genotypic assays.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. População sobrevivente (%) às condições de 80°C/30min, 90°C/10min., 100°C/5 min. e 110°C/5min das bactérias esporuladas isoladas de amostras de matéria-prima e produto final de ovo líquido pasteurizado resfriado.....	68
Figura 2. População sobrevivente (%) de bactérias esporuladas isoladas de amostras dos fornecedores (A, B, C, E, F e N) e produto final (OLIP e GLF) às condições de 80°C/30min, 90°C/10min., 100°C/5 min. e 110°C/5min em ovo líquido pasteurizado resfriado.....	69
Figura 3. Distribuição das espécies de bactérias formadoras de esporos isolados da matéria-prima e produto final de ovo líquido pasteurizado resfriado baseada na similaridade das sequências do gene RNA ribossomal 16S do servidor Identify.....	73
Figura 4. Distribuição das bactérias formadoras de esporos isoladas da matéria-prima e produto final de ovo líquido pasteurizado em nível de gênero (A), associados em grupos (B) e espécies do grupo de <i>B. cereus</i> baseada na similaridade das sequências do gene RNA ribossomal 16S do servidor Identify.....	73
Figura 5. Árvore filogenética Neighbohr-Joining baseada nas sequências parciais do gene RNA ribossomal 16S dos isolados que compõem a comunidade de bactérias formadores de esporos recuperada da matéria-prima e produto final de ovo líquido pasteurizado resfriado.....	76
Figura 6. Amplificação do gene <i>spoVAD</i> em alguns isolados.....	78
Figura 7. Amplificação do gene <i>clpC</i> em alguns isolados.....	79
Figura 8. Amplificação do gene <i>cdnL</i> em alguns isolados.....	80
Figura 9. Amplificação do gene <i>dacB</i> em alguns isolados.....	81
Figura 10. Análise de componentes principais (A) e dendrograma de distâncias euclidianas (B) para o agrupamento dos genes de resistência de acordo as condições de 80°C/30min, 90°C/10min., 100°C/5 min. e 110°C/5min.....	87
Figura 11. Análise de componentes principais (A) e dendrograma de distâncias euclidianas (B) para o agrupamento dos genes de resistência de acordo com os pré-tratamentos da matéria-prima.....	88
Figura 12. Análise de componentes principais (A) e dendrograma de distâncias euclidianas (B) para o agrupamento dos genes de resistência de acordo a origem das amostras: fornecedores (matéria-prima) e produto final.....	89

Figura 13. Análise de componentes principais (A) e dendrograma de distâncias euclidianas (B) para o agrupamento dos genes de resistência de acordo com os tipos de produtos derivados de ovos.....	91
Figura 14. Perfis de RAPD a partir de DNA genômico dos isolados esporulados recuperadas da matéria-prima e produto final e ovo líquido pasteurizado resfriado gerados por os primers OPR-8, OPR-2 e OPR-13 em 7 cepas de <i>B. paramycoides</i>	92
Figura 15. Dendrograma construído pelo método de grupos de pares não ponderados com média aritmética (UPGMA) mostrando dissimilaridade entre haplótipos de DNA polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD) de 50 cepas isoladas de ovo líquido pasteurizado usando o primer OPR-2.	95
Figura 16. Dendrograma construído pelo método de grupos de pares não ponderados com média aritmética (UPGMA) mostrando dissimilaridade entre haplótipos de DNA polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD) de 50 cepas isoladas de ovo líquido pasteurizado usando o primer OPR-8.	96
Figura 17. Dendrograma construído pelo método de grupos de pares não ponderados com média aritmética (UPGMA) mostrando dissimilaridade entre haplótipos de DNA polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD) de 50 cepas isoladas de ovo líquido pasteurizado usando o primer OPR-13.	97
Figura 18. Árvore filogenômico de 4 cepas resistentes a 80°C/30min., 90°C/10min., 100°C/5min. e 110°C/5min.	99
Figura 19. Análise do diagrama de Venn dos genes que expressam proteínas ortólogas identificadas da análise genômico.....	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Temperatura de melting, %GC e comprimento dos primers desenhados para os genes <i>cdnL</i> , <i>spoVAD</i> e <i>clpC</i>	61
Tabela 2. Valores de semelhança das sequências 16S rRNA de isolados da matéria-prima e produto final de ovo líquido pasteurizado.....	72
Tabela 3. Caracterização genética da resistência ao calor de 50 isolados agrupados segundo a resistência às condições de 80°C/30min, 90°C/10min., 100°C/5 min. e 110°C/5min.....	85
Tabela 4. Distribuição das cepas nos poços de gel de agarose do perfil de RAPD gerados por os primers OPR-8, OPR-2 e OPR-13 em 7 cepas de <i>B. Paramycoides</i>	93
Tabela 5. Características gerais do genoma de 4 cepas (A, B, C e D) representantes da resistência a 80°C/30min., 90°C/10min., 100°C/5min. e 110°C/5min.....	98

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas

BLAST – Basic Local Alignment Search Tool

UFC – Unidades Formadoras de colônias

DNA – Ácido desoxirribonucleico

NCBI – National Center for Biotechnology Information

pb – pares de bases

SDS – Dodecilsulfato de sódio;

°C – grau Celsius

μL – microlitros

NaCl – Cloreto de sódio

min – minutos

% - por cento

V – Volteios; **PCR** – Reação em cadeia da polimerase, siglas em inglês

RNA – Ácido ribonucleico

MgCl₂ – Cloreto de magnésio

pH – potencial hidrogeniônico

TSB – Caldo soja tripticaseína, siglas em inglês

MgSO₄ – Sulfato de magnésio

dNTP – Deoxynucleotide

g/mL – gramas por mililitro

SUMÁRIO

Introdução geral.....	15
Revisão bibliográfica.....	17
Bactérias formadoras de esporos.....	18
Importância dos esporulados na deterioração dos alimentos e na saúde.....	18
Resistência nas bactérias esporuladas.....	21
Resistência térmica.....	22
Mecanismos de resistência térmica do esporo.....	23
Deterioração de ovo e produção do “Ovo líquido pasteurizado”.....	27
Métodos de caracterização por fingerprinting “genotipagem”.....	29
Referência Bibliográfica.....	31
Capítulo 1: Caracterização da resistência ao calor e diversidade genética de bactérias mesófilas formadoras de esporos isoladas de ovo líquido pasteurizado.....	50
Resumo.....	51
1. Introdução	53
2. Material e Métodos.....	55
2.1 Amostras de matérias-primas produto finais.....	55
2.2 Contagem de bactérias mesófilas esporuladas.....	55
2.3 Cepas de bactérias formadoras de esporos.....	56
2.4 Preparo das suspensões de esporos.....	56
2.5 Seleção das cepas mais resistentes as condições de 80°C/30min, 90°C/10min., 100°C/5 min. E 110°C/5min.....	57
2.6 Identificação das bactérias esporuladas mesófilas pela técnica de sequenciamento do gene 16S RNA.....	57
2.7 Diversidade genética das bactérias esporuladas mesófilas mais resistentes aos choques térmicos sucessivos.....	59
2.8 Amplificação e sequenciamento de genes associados a resistência ao calor.....	60
2.8.1 Desenho dos primers para os genes <i>cdnL</i> , <i>spoVAD</i> e <i>clpC</i>	60
2.8.2 Reações de PCR para os genes associados a resistência ao calor.....	61
2.9 Sequenciamento do genoma.....	62
2.9.1 Análises estatísticos.....	63

3. Resultados e Discussão.....	64
3.1 Caracterização fenotípica.....	64
3.2 Estrutura e composição da comunidade de bactérias formadoras de esporos de productos de ovo pasteurizado.....	70
3.3 Filogenia dos isolados bacterianos com base no sequenciamento parcial rRNA.....	74
3.4 Caracterização gênica da resistência ao calor.....	76
3.4.1 Amplificação de genes associados à resistência ao calor.....	76
3.5 Caracterização fenotípica x genotípica da resistência ao calor.....	82
3.6 Correlação de genes de resistência ao calor de acordo com a temperatura, pré- tratamento, Fornecedores e produto final.....	87
3.7 Diversidade genética das bactérias esporuladas mesófilas mais resistentes aos choques térmicos sucessivos.....	92
3.8 Sequenciamento do genoma de 4 cepas de esporulados sobrevivente a 80°C/30 min., 90°C/10 min., 100°C/5 min. e 110°C/5 min.....	98
4. Conclusões.....	104
5. Referências Bibliográfica.....	106
6. Apêndices.....	120

INTRODUÇÃO GERAL

A diversidade de nutrientes, a alta digestibilidade, o preço acessível e suas propriedades reológicas destacaram o ovo como um alimento fundamental na nutrição humana e com transcendência na indústria de alimentos (Réhault-Godbert et al., 2019). O ovo em casca é um produto altamente perecível e com alta demanda no mercado, o que conduziu à fabricação de produtos derivados de ovo (ovoprodutos), dentre os quais se incluem o ovo inteiro, clara e gema pasteurizada em suas versões líquidas, congeladas ou desidratadas. O processamento de produtos derivados do ovo tem se convertido em uma indústria de rápida expansão (Viator et al., 2016).

O potencial de contaminação, seja da casca ou do conteúdo do ovo, por micro-organismos patogênicos ou deteriorantes, representa um grande risco para as indústrias e consumidores (Techer et al., 2019a). A prevalência, excepcionalmente alta, de patógenos como a *Salmonella* sp., devido a sua capacidade de penetração na casca, ou a transferência mediante oviduto da galinha, infecta o conteúdo do ovo, fazendo com que este se torne um dos principais agentes associados a doenças transmitidas por alimentos em ovoprodutos (James et al., 2002)(Keerthirathne et al., 2017). Sua presença tem levado a indústria a implementar medidas de vigilância cada vez mais rigorosas durante o processamento. Sua detecção, no produto final, geralmente está vinculada a tratamentos ineficientes de pasteurização.

Por outro lado, a sensibilidade da matéria-prima a altas temperaturas usadas no processamento do ovo converte a eliminação ou a redução dos esporos bacterianos e *Enterococcus* em um grande desafio para a indústria (Soni et al., 2018) (Techer et al., 2015a). Temperaturas desenhadas para a pasteurização de produtos de ovo líquido, em geral 60°C por 3 minutos, resultam ser incapazes de destruir os esporos bacterianos.

Os esporos permitem às bactérias sobreviverem a condições extremas usadas na cadeia produtiva dos alimentos. Logo, células vegetativas são capazes de emergir (germinação) frente a condições favoráveis através de mecanismos regulados geneticamente. Como resultado, estas células são metabolicamente ativas e responsáveis por provocarem intoxicação alimentar e deterioração da matéria-prima e produto final. Entre as principais bactérias formadoras de esporos contaminantes de ovoprodutos se incluem: *Bacillus cereus* sensu lato, *Lysinibacillus fusiformis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* e *Clostridium* spp. (Postollec et al., 2012a)(Techer et al., 2019a). Estes micro-organismos nem sempre têm causado doenças, pois apenas algumas concentrações a desenvolvem. Deste modo, a pesquisa deve focar no controle dos

esporulantes ao longo do processamento e evitar a proliferação no produto final.

O calor tem sido usado para a eliminação/redução da microbiota contaminante, mas nem sempre a temperatura utilizada para obter um produto inócuo (livre de patógenos) e de qualidade tem permitido manter as propriedades nutritivas ou tecnológicas do produto. Consequentemente, são usados outros mecanismos e tecnologias que ajudem a reduzir a carga microbiana, diminuindo as probabilidades de persistência dos mesmos no produto final. Assim, o uso sinérgico de pré-tratamentos, que apresentou resultados otimistas frente aos esporos bacterianos, foi uma forma de reduzir o calor agressivo em alimentos sensíveis.

A implementação de medidas de pré-tratamento de higienização, como a descontaminação dos ovos com casca, garante aos consumidores ovos com casca e ovoprodutos seguros para o consumo direto, além da utilização de seus ingredientes ser confiável, como por exemplo, em outros produtos alimentícios. Além disso, o controle da rastreabilidade dos fornecedores da matéria-prima poderá, também, garantir a qualidade da matéria-prima.

Os procedimentos e tecnologias para a descontaminação de ovos com casca, antes da quebra, incluem o uso de desinfetantes químicos, pasteurização, tecnologias de ultrassom térmico, tratamento com ozônio, tratamento a plasma não térmico de gás, água eletrolisada ácida, tecnologia de luz pulsada, irradiação UV, fumigação com formaldeído (Singh and Brar, 2016) (Lv et al., 2019). É sempre bom ressaltar que uma combinação de boas práticas e estratégias de descontaminação é essencial para limitar o contato entre a parte externa da casca e o conteúdo do ovo, pois propicia melhoras na segurança e qualidade do produto (Keerthirathne et al., 2017). Portanto, este estudo teve como objetivo caracterizar feno e genotipicamente a resistência térmica e a variabilidade genética da diversidade bacteriana isoladas de amostras da matéria-prima (diferentes fornecedores de ovo) e produto final (diferentes lotes) de ovo líquido pasteurizado.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A. Bactérias formadoras de esporos

As bactérias formadoras de esporos são micro-organismos, que, em algum momento de seu ciclo de vida, conseguem se diferenciar em entidades resistentes com o objetivo de perpetuar a sua ocorrência em um determinado ambiente. As propriedades físico-químicas do esporo lhe permitem encarar condições adversas relacionada ao calor, pH, oxigênio, nutrientes, atividade de água, pressão e outros (Markland and Hoover, 2016) (Setlow and Johnson, 2019). As bactérias esporuladas estão predominantemente associadas ao phylum Firmicutes, especificamente à família *Bacillaceae* e aos membros do gênero *Clostridium* (André et al., 2017)(Garde et al., 2018). *Bacillus* e *Clostridium* têm sido os gêneros esporulados mais estudados no decorrer do tempo (Markland et al., 2013)(Singh, 2017), devido à presença de espécies patogênicas e deteriorantes que resultaram em surtos transmitidos por alimentos e perdas econômicas nas indústrias de alimentos, respectivamente (Remize, 2016).

a.1) Importância dos esporulados na deterioração dos alimentos e na saúde

A importância do estudo dos esporos bacterianos reside, principalmente, na capacidade de resistir a condições adversas como a exposição sub agentes físico-químicos: altas temperaturas, congelamento, irradiação, desidratação, presença de conservantes, tratamento com desinfetantes, entre outros (Setlow, 2014)(Setlow and Johnson, 2019). A sobrevivência a condições extremas possibilita o desenvolvimento das bactérias formadoras de esporos em mais de um habitat. Os esporos bacterianos têm sido encontrados em todo tipo de amostra ambiental (W L Nicholson et al., 2000). Diversos estudos (Postollec et al., 2012a)(Hong et al., 2009) determinaram concentrações de *Bacillus sp.* e *Clostridium sp.* entre 10^5 - 10^6 esporos/gramas de solo, uma vez que o solo é considerado um dos mais importantes reservatórios e um dos principais focos de dispersão para outros nichos ambientais. Consequentemente, é inevitável que os esporos entrem na cadeia produtiva dos alimentos (Checinska et al., 2015). A ocorrência de uma microbiota associada à matéria-prima (de origem vegetal e animal) e a exposição aos distintos processos industriais converte os alimentos em sistemas que precisam ser avaliados para que seja garantida sua inocuidade. O uso de matéria-prima e de ingredientes contaminados com baixa população de esporulados ($2\log_{10}$ CFU per g/mL) de bactérias formadoras de esporos é crucial para a obtenção de produtos estáveis e microbiologicamente seguros (Pereira and Sant'Ana, 2018a).

A ampla diversidade taxonômica e, conseqüentemente, a versatilidade metabólica atribuem às bactérias esporuladas a capacidade de sintetizar enzimas hidrolíticas, como lipases ou proteases, que provocam a decomposição dos alimentos, e, eventualmente, a perda das características sensoriais, nutricionais e tecnológicas dos produtos susceptíveis (Techer et al., 2015a). Do mesmo modo, a presença de esporulados responsáveis pela produção de diferentes toxinas impactou negativamente, ao longo do tempo, a saúde humana e animal. Dentro do grupo dos aeróbios facultativos esporulados existem espécies de *Bacillus* intimamente relacionadas que constituem o grupo *Bacillus cereus sensu lato*. Estas espécies incluem o *B. cereus*, *B. anthracis* e *B. thuringiensis*, os quais têm sido comumente reportados como micro-organismos patogênicos (Ehling-Schulz et al., 2019). Porém, só algumas cepas de *B. cereus* foram encontradas como os principais responsáveis por surtos de doenças transmitidas por alimentos, tais como a síndrome diarreico e emético (Berthold-Pluta et al., 2019). A síndrome diarreica é causada por toxinas lábeis ao calor (enterotoxinas Hbl, Nhe e CYtK) sintetizadas por células vegetativas no intestino do hospedeiro (toxi-infecção) em uma dose $10^4 - 10^9$ células/ gramas de alimento (Lindbäck and Granum, 2008). Por outro lado, a síndrome emética é causada pelo consumo do alimento contaminado com uma toxina (intoxicação) estável ao calor, a cereulide. A dose suficiente para causar a intoxicação é de $10^5 - 10^8$ esporos/grama de alimento. Porém, existem cepas de *B. cereus* capazes de causar intoxicação alimentar com apenas uma dose de $10^3 - 10^4$ células/ gramas de alimento, resultando em um grande desafio para as indústrias de alimentos e centros de abastecimento de matéria-prima (EFSA, 2014).

Além de *B. cereus*, existem outras espécies como *B. licheniformis* (Salkinoja-Salonen et al., 1999), *B. subtilis* (From et al., 2005) e *B. mojavensis* (Apetroaie-Constantin et al., 2009), que, raramente, foram isoladas a partir de casos de doenças associados aos alimentos, mas é sabido que se encontram envolvidos também na produção de metabolitos tóxicos. Nos poucos casos reportados, foram descritos sintomas correspondentes a gastroenterites, mas ainda há muitas questões para serem esclarecidas. (Carlin and Nguyen-The, 2013) (Lavermicocca et al., 2016).

Os anaeróbios esporulados encontram-se representados por membros do gênero *Clostridium*. Cepas patogênicas de *C. botulinum* e *C. perfringens* são os agentes mais reportados em casos de intoxicação alimentar. No entanto, *C. botulinum* produz uma potente neurotoxina classificada em 7 tipos (A-G) e das quais apenas 4 causam doença em humanos (A, B, E e F). Quantidades tão baixas (30-100 ng) de neurotoxina botulínica são suficientes para causar a

doença em humanos. A neurotoxina do tipo E, produzida por *C. botulinum* psicotrófico e não proteolíticos, é secretada a temperaturas mais baixas que 3°C, enquanto a do tipo A, B e F são produzidas pelo grupo mesófilo e proteolítico. Não obstante, as neurotoxinas produzidas por cepas psicrotróficas sejam as mais reportados (Markland et al., 2013), o *C. perfringens* tem sido notificado em alimentos inadequadamente cozidos e refrigerados. Especificamente, existem vários tipos de *C. perfringens* (A-F). O tipo A produz uma alfa toxina que causa doença aguda, transmitida nos seres humanos através dos alimentos, causando diarreia e desconforto abdominal (Rabinowitz and Conti, 2010).

B. Resistência nas bactérias esporuladas

Devido a sua capacidade de resistência, a persistência de bactérias formadoras de esporos na cadeia produtiva dos alimentos, inclusive no produto final, tornou-se uma grande problemática em âmbito mundial. O fato desse grupo de bactérias poder causar agravos na indústria alimentar tem despertado o interesse nos mecanismos de resistência e na forma como estes podem ser neutralizados.

Embora algumas bactérias formadoras de esporos não causem danos aparentes nos alimentos nem ao consumidor, em altas concentrações podem reduzir o valor do produto alimentício. Por exemplo, a presença de bacilos termófilos, como *Anoxybacillus flavithermus* e *Geobacillus stearothermophilus* em laticínios, é um indicador de falta de higiene que, inclusive, em altas concentrações torna o alimento inaceitável para o consumidor (Burgess et al., 2010a)(Soni et al., 2016). Em sua forma esporulada, estes micro-organismos perdem sua capacidade proliferativa, porém em condições favoráveis em um alimento desencadeiam o processo de germinação (Piggot and Hilbert, 2004) e a multiplicação exponencial das células vegetativas.

A resistência dessas bactérias frente ao calor úmido e seco, dessecação, radiação UV e γ , frente a enzimas que hidrolisam a parede celular bacteriana e a uma variedade de produtos químicos tóxicos como agentes genotóxicos, agentes oxidantes, aldeídos, ácidos e álcali(Setlow, 2014) deve-se, principalmente, à estrutura particular do esporo. O esporo é formado por várias camadas que incluem o exosporium, a capa proteica, a membrana externa, o córtex, a parede germinativa da célula, a membrana interna e o núcleo do esporo.

O exosporium, presente em algumas espécies de *Bacillus* como: *B. megaterium*, *B. anthracis*, e *B. cereus*, proporciona uma superfície hidrófoba que aprimora as propriedades adesivas nas superfícies hidrofóbicas, além de favorecer a resistência aos tratamentos químicos e enzimáticos (Rönnner et al., 1990) (Henriques and Moran, 2007)(Stewart, 2015). A capa proteica atua como barreira de permeabilidade, restringindo a passagem de moléculas grandes como enzimas e nutrientes, assim também como desintoxicante de uma variedade de produtos

químicos biocidas (Henriques and Moran, 2007) (Mckenney et al., 2013). A camada proteica e a camada externa contêm pigmentos que absorvem fortemente a região UV. Vale sinalizar que evidências demonstraram um papel significativo na resistência a raios UV (Khaneja et al., 2010). O córtex e a parede germinativa são importantes, sobretudo, para a viabilidade do esporo, e sabe-se também que o córtex protege o esporo de dano frente aos solventes químicos (Khaneja et al., 2010)(Setlow, 2006) . A membrana interna protege o núcleo, porque atua como barreira de produtos químicos (Russell, 1990a) . Finalmente, as condições que apresentam o núcleo como baixo teor de água (25 a 55% do peso úmido) favorecem a resistência do esporo ao calor úmido. O alto nível de ácido piridina-2,6-dicarboxílico (ácido dipicolínico [DPA]), junto a vários cátions divalentes, como Ca^{2+} , favorece a resistência frente a agentes prejudiciais do DNA. Já os altos níveis de um grupo de proteínas que saturam o DNA de esporos denominadas pequenas proteínas de esporos solúveis em ácido (SASPs) do tipo α/β protegem o DNA do esporo contra o dano frente a produtos químicos genotóxicos, dessecação, calor úmido e radiação UV e γ (Ki et al., 2008).

Com o avanço do tempo, as indústrias alimentárias têm utilizado ativamente estratégias para garantir a inativação adequada dos esporos e controlar o crescimento das células vegetativas. Nesse sentido, a tecnologia emergente e os métodos convencionais têm evoluído cada vez mais em eficiência frente ao controle destes tipos de micro-organismos; (Raso and Barbosa-Cánovas, 2003).

b.1) Resistência térmica

Para o controle dos micro-organismos patogênicos e deteriorantes, tradicionalmente a indústria alimentar tem utilizado o calor. Tratamentos térmicos moderados, como a pasteurização ($<75^{\circ}\text{C}/15$ seg.), foram desenhados para eliminar as células vegetativas patogênicas (Heyndrickx and Scheldeman, 2008) e tratamentos mais intensos como a esterilização (121°C por uma duração dependendo do organismo *alvo*) criada para a inativação, principalmente de esporos de *Bacillus* e *Clostridium* (Oomes et al., 2007).

Embora seja um tratamento amplamente usado, a pasteurização proporciona um ambiente adequado para o desenvolvimento das células vegetativas das bactérias esporulantes desde que elimine as células vegetativas potencialmente competidoras. Deste modo, a esterilização envolve a eliminação dos esporos e garante períodos de vida de prateleira mais longo, tornando os alimentos ainda mais seguros. Apesar disso, sua aplicação encontra-se limitada a certos

alimentos sensíveis ao calor. Portanto, a escolha do tratamento depende das características termodinâmicas do alimento e da resistência do micro-organismos a serem eliminados.

O estudo das bactérias formadoras de esporos envolvidas na qualidade microbiológica e na segurança alimentar tem sido de grande interesse devido a sua persistência na cadeia produtiva, inclusive no produto final. Assim, foram relatados casos de ocorrência de aeróbios e anaeróbios formadores de esporos fortemente resistentes ao calor na indústria de laticínios como em leite UH, leite em pó, queijo “requeijão cremoso” (Rueckert et al., 2005) (Sadiq et al., 2016a) (Sadiq et al., 2018a) (Burgess et al., 2010b) (Aouadhi et al., 2014) (Oliveira et al., 2018). A presença de esporos de *Geobacillus stearothermophilus* e *Moorella thermoacetica* representa um problema, sobretudo em bebidas enlatadas devido à persistência termofílica destes microrganismos (Nakano, 2018). Esporos do grupo de *B. cereus* e em menor proporção de *Lysinibacillus* sp. foram encontrados em produtos derivados de ovo (Techer et al., 2019b) (Techer et al., 2014b) (Techer et al., 2014a). Em alimentos secos, como lentilhas vermelhas, feijão e cereais; e derivados, tais como grãos de arroz cru, revelaram alta prevalência de esporos de *B. cereus* a níveis em que a produção de enterotoxina poderia se tornar significativa (Portnoy et al., 1976) (Blakey and Prlestdt, 1980) (Duc et al., 2005) (Bilung et al., 2016). Especiarias, ervas e aditivos não foram a exceção, resultados mostraram também a ocorrência de *B. cereus* (Baxter and Holzapfel, 1982) (Fogele et al., 2018). Em cacau, açúcar e amido, alimentos usados como ingredientes para a fabricação de uma ampla variedade de produtos, detectou-se a presença de bactérias formadoras de esporos como principais contaminantes devido às características do processamento que favorecem a seleção dos mais resistentes (Pereira and Sant’Ana, 2018a). Em adição, a persistência do esporo no produto final não poderia estar refletindo só a capacidade de sobrevivência do esporo a tratamentos de calor durante o processamento, mas também poderia ser resultado de tratamentos deficientes de esterilização da embalagem e de higienização de máquinas de enchimento (Scheldeman et al., 2006) (Sadiq et al., 2018b).

b.2) Mecanismos de resistência térmica do esporo

A exposição a condições desfavoráveis, como por exemplo altos tratamentos térmicos, ativa processos celulares e genéticos que darão lugar a uma estrutura mais resistente, o esporo. Os fatores envolvidos na resistência ao calor do esporo incluem a saturação com proteínas pequenas ácido-solúveis (SASP) do tipo α/β , o acúmulo de cátions divalentes como Ca^{+2} e Mn^{+2} , a desidratação do esporo e a presença do ácido dipicolínico (ácido piridina-2,6-

dicarboxílico; DPA) (Setlow and Johnson, 2019).

b.2.1) Saturação com proteínas SASP do tipo α/β

As pequenas proteínas SASP do tipo α/β constituem o 3-5% das proteínas totais do esporo e encontram-se em todas as espécies Bacillales e Clostridiales formadoras de esporos. As SASP do tipo α/β são proteínas altamente conservadas nestas espécies e estão codificadas por 7 a mais genes, das quais os genes *sspA* e *sspB* são os de maior importância e se expressam simultaneamente (Setlow and Johnson, 2019). A proteção do DNA nos esporos contra o dano à dessecação, ao calor seco e úmido parece depender dos altos níveis de saturação exercidos pelas SASP do tipo α/β (Hackett and Setlow, 1988)(Setlow, 2006)(Cortesão et al., 2019).

b.2.3) Presença do ácido piridina-2,6-dicarboxílico (DPA)

As sínteses de DPA ocorrem em apenas uma etapa a partir do ácido dihidroxidipicolínico, um intermediário na biossíntese de lisina. ODPa é sintetizado durante a formação da córtex do esporo no compartimento das células-mãe da célula esporulada e, finalmente, absorvido no forespore (Setlow, 2006). As proteínas envolvidas no transporte/absorção de DPA são codificadas por, pelo menos, um dos genes do operon *spoVA* (*spoVAA*, *spoVAB*, *spoVAC*, *spoVAD*, *spoVAEb*, *spoVAEa* e *spoVAF*). No entanto, apenas os cinco primeiros genes são essenciais para completar a esporulação (Tovar- Rojo et al., 2002). Além disso, foi relatado que os genes *spoVAC*, *spoVAD* estão associados com a membrana interna do esporo (Velásquez et al., 2014) (Vepachedu and Setlow, 2005); contudo, o gene *spoVAF* não tem demonstrado ser imprescindível na esporulação, já que, em cepas em que o gene estava ausente, o desenvolvimento da esporulação não foi afetada (Perez-Valdespino et al., 2014).

Por outro lado, o operon *spoVA* presente no transposon Tn1546 foi designado como *spoVA*^{2mob} operon e representa um dos cinco operones do transposon (Berendsen et al., 2016). O operon *spoVA*^{2mob} carrega genes que codificam proteínas homólogas às do operon *spoVA*, tais como o *spoVAC*^{2mob}, *spoVAD*^{2mob} e *spoVAEb*^{2mob}, além de outros 4 genes que codificam proteínas com funções desconhecidas. Entretanto, presume-se que as proteínas codificadas intensificam a absorção de DPA no núcleo do esporo (Berendsen et al., 2016). Este evento foi demonstrado em esporos de *B. subtilis*, onde a inserção de *spoVA*^{2mob} deu como resultado esporos altamente resistentes ao calor úmido, porém ao ser eliminado *spoVA*^{2mob} de cepas de *B. subtilis*, carregando Tn1546, resultaram em esporas sensíveis ao calor. Cepas de *B.*

amyloliquefaciens e *B. licheniformis* que carregavam o *spoVA*^{2mob} mostraram diferenças significativas na resistência em relação às que não apresentavam o operon. Em *B. licheniformis*, essas diferenças não foram tão relevantes como em *B. amyloliquefaciens* e *B. subtilis*. Neste estudo, descreveu-se uma relação diretamente proporcional ao número de cópias do operon *spoVA*^{2mob} e à resistência adquirida em cepas de *B. subtilis* (Berendsen et al., 2016).

É importante lembrar que o operon *spoVF* é responsável pela síntese da DPA sintetase, enzimas biosintéticas da lisina, as quais, por sua vez, catalisam a síntese do DPA e são codificadas por 2 genes do operon *spoVF* (Paidhungat et al., 2000). A mutação no locus *spoVF*, além de dar origem a esporos com menor quantidades de DPA, resultam em esporos instáveis com alta probabilidade de lises durante a esporulação. Por outro lado, a eliminação de *spoVF* locus poderia também aumentar significativamente o conteúdo da água no núcleo do esporo, diminuindo ainda mais a sua capacidade de resistência (Paidhungat et al., 2000) (Tovar-Rojo et al., 2002).

b.2.2) Baixo teor de água e acúmulo de cátions divalentes

Durante a formação do esporos, o DPA capturam íons divalentes numa proporção 1:1 deslocando a água do núcleo (Driks and Setlow, 2014) (Setlow, 2014). Posteriormente, na esporulação também são transferidas quantidades significativas de água do núcleo, reduzindo ainda mais o conteúdo da água (Coleman et al., 2007). A resistência dos esporos ao calor úmido está determinada, em grande parte, pelo conteúdo de água no núcleo do esporo, que é muito menor em comparação ao protoplasto das células vegetativas. A mineralização do núcleo mediante a formação do complexo DPA-Ca²⁺ demonstrou provocar a desidratação do núcleo do esporo para níveis muito baixos de água, favorecendo sua resistência frente ao calor (Leuschner and Lillford, 2000). Por outro lado, os níveis e o tipo de íons minerais em relação à resistência resultaram também influenciar na resistência ao calor do esporo. Alguns estudos mostraram que altos níveis de íons de Ca²⁺ no núcleo do esporo contribuem mais significativamente para a resistência ao calor úmido que altos níveis de Mg²⁺ ou Mn²⁺. Assim, a deleção de alguns dos genes do operon *dacB-spmA-spmB* presente em *B. subtilis* e *Clostridium perfringens*, resultou em esporos com elevado teor de água no núcleo, instáveis e mais sensíveis ao calor, que foram facilmente destruídos frente a tratamento térmico (Popham et al., 1995)(Orsburn et al., 2009)(Paredes-Sabja et al., 2008). De outro modo, cepas expostas a altas temperaturas podem resultar até 10 vezes mais resistentes ao calor úmido, provavelmente, devido à quantidade relativamente baixa de água no núcleo (Melly et al., 2002)(Warda et al., 2015). No caso de

esporos de termófilos, o aumento da resistência ao calor úmido de seus esporos pode estar relacionada à termoestabilidade intrínseca de suas proteínas (Nicholson et al., 2000)(Setlow, 2006).

b.2.3) Reparação de danos do esporo

Além da presença de uma rede de mecanismos de resposta contra o estresse ao calor e a composição da estrutura do esporo, existem também algumas proteínas envolvidas na reparação de danos nos esporos. O CdnL é um regulador transcricional putativo, que demonstrou estar envolvido no reparo e posterior crescimento dos esporos de *B. cereus* danificados pelo calor (Warda et al., 2016b). O papel na reparação por danos ao calor foi determinado mediante mutações dirigidas em cepas de *B. cereus*. Os resultados obtidos foram a inativação de 2 log da população e, acima de 95% da população sobrevivente, seus esporos resultaram danificados, em comparação com as cepas não mutantes (Warda et al., 2016a).

b.2.4) Adaptação (“proteínas do choque térmico” e “proteínas gerais do estresse”)

Como se percebe nas situações descritas acima as bactérias têm desenvolvido mecanismos de adaptação para a sobrevivência sob condições de estresse; assim, uma dose inicial de calor não letal pode induzir resistência transitória ao tratamento térmico mediante um fenômeno denominado termotolerância, e as bactérias formadoras de esporos não são a exceção em apresentar estes mecanismos. Hoje em dia, sabe-se que a resposta ao choque térmico de *B. subtilis* se compõe de seis classes de genes induzidos por choque térmico baseados em seus mecanismos reguladores (Hecker et al., 1996).

Os genes que codificam as proteínas do choque térmico de classe I são regulados pelo promotor σ^A . Esses genes, vale lembrar, estão organizados em dois operones o *dnaK* e *groE*, e são particularmente induzidos por estresse ao calor. O operon *dnaK* está constituído pelos genes *grpE*, *dnaK* e *dnaJ*; já o operon bistrônico *groE* está constituído pelos genes *groES* e *groEL*; ambos regulados pelo repressor *hrcA*. (Selby et al., 2011)(Hecker et al., 1996). Genes de importância na resposta ao estresse ao calor como o gene *dnaK* de *B. pumilus* (Kumar et al., 2014) ou os genes *dnaK*, *dnaJ* e *groE* de *B. licheniformis* foram clonados e expressados em *Escherichia coli*, demonstrando sua função protetora contra a desnaturação frente a temperaturas altas (Liang et al., 2009).

Os genes que conformam a classe II são dependentes do promotor fator sigma alternativo σ^B , o qual ativa a transcrição em condições de temperatura elevada de alguns genes como o *rsbV*,

rsbW e *rsbX* (Reder et al., 2012). De outro modo, o RsbR é uma proteína que atua como sensor a altas temperaturas e controla a atividade do σ^B , considerando-se o segundo termômetro celular (Martinez et al., 2010)(He et al., 2019). Seguidamente, um fator σ^F pode responder frente a elevadas temperaturas, dando lugar à regulação da esporulação. Genes da classe III formam parte do regulon CtsR que respondem ao estresse e ao calor, mas são fortemente reprimidos sob exposição prolongada. Os genes *clpC*, *clpE*, *clpP*, *ctsR*, *mcsA* e *mcsB* formam parte do regulon CtsR e são responsáveis pela ligação ao DNA e detecção do calor. Os genes da classe IV não estão envolvidos no desenvolvimento da termotolerância. Os genes da classe V incluem os genes de choque térmico *htrA* e *htrB*, responsáveis pelo controle do regulador de estresse e do sensor. Por último, dez genes do choque térmico encontram-se na formação da classe VI, cujos mecanismos reguladores ainda não foram identificados (Abee and Wouters, 1999)(Periago et al., 2002) (Noor et al., 2019).

Existem proteínas que respondem a diferentes condições de estresse; tratam-se das “proteínas gerais do estresse”, responsáveis pela proteção geral e inespecífica da célula sob condições adversas. Entretanto, vão desencadear uma série de sinais extracelulares que irão induzir um conjunto de proteínas específicas, as quais, por sua vez, proporcionarão proteção contra um fator de estresse específico (Hecker et al., 1996). Tanto as características inerentes das bactérias formadoras de esporos, como o uso de tratamentos térmicos mais leves pelas indústrias de alimentos podem contribuir na geração de populações de esporos subletalmente danadas em lugar de inativadas, assim como células vegetativas termotolerantes frente a câmbios de temperaturas de estresse para as células (Warda et al., 2016b).

C. Deterioração de ovos e produção do “ovo líquido pasteurizado”

Como se sabe o ovo é uma valiosa fonte de nutrientes como proteínas, gorduras, vitaminas, minerais e apenas um traço de carboidratos. Nutricionalmente, é considerado um dos alimentos mais completos na dieta humana por conter, além dos nutrientes supracitados, todos os aminoácidos essenciais. Porém, todas essas características nutricionais constituem o médio ideal para o desenvolvimento de micro-organismos, uma vez que contaminam a casca, penetram as camadas internas e finalmente acessam ao conteúdo do ovo (Techer et al., 2015a). O ovo recém depositado é geralmente estéril, pois a microbiota só se formará após o contato com a cloaca da galinha, matérias do ninho (pó e fezes), entre outros elementos do ambiente. Com tudo isso, o processo que dá origem a produtos derivados do ovo, como ovo inteiro, gema ou clara líquido podem ser afetados pela contaminação sistemática devido ao contato inevitável

com a casca do ovo (Techer et al., 2019b).

A presença de micro-organismos capazes de produzir enzimas que digerem e assimilamos nutrientes da matriz do alimento causam a deterioração dos produtos de ovos. Um estudo da microbiota da casca e do conteúdo do ovo determinou a presença de *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.*, *Campylobacter sp.*, *Listeria sp.*, enterobactérias (*Escherichia coli*, *Salmonella sp.*, *Proteus sp.*, *Aeromonas sp.*, *Serratia sp.*, *Enterobacter sp.*, *Acinetobacter sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Alcaligenes sp.*). (Gram et al., 2002) (Abdullah, 2010) (Techer et al., 2015) (Albino et al., 2018), *Bacillus sp.* e *Clostridium sp.* Entretanto, em outro estudo baseado em produtos derivados de ovos (ovo inteiro, clara de ovo, gema e ovo em pó), determinou-se a presença do grupo *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *Lysinibacillus fusiformis* e *Clostridium spp.* Por outro lado, cabe ressaltar que a maior ocorrência foi principalmente de *B. weihenstephanensis* e *B. mycoides*, ambos pertencentes ao grupo *Bacillus cereus* (Postollec et al., 2012b) (Cribben and McDermott, 2012) (Lindbäck and Granum, 2008) (Jan et al., 2011).

A resistência e ubiquidade tornam quase impossível garantir a eliminação dos formadores de esporos de um determinado ambiente, sendo sua redução um desafio. A importância da persistência dos esporos no processamento de ovo se baseia na capacidade de algumas cepas causarem doença a uma determinada concentração, além da sua ampla atividade enzimática, responsável pela deterioração do produto final.

O ovo líquido pasteurizado tem alcançado uma alta demanda no mercado nos últimos anos, provavelmente porque, além de conseguir manter suas características tecnológicas e nutricionais, resulta ser vantajoso de ser transportado e estocado (volume ocupado, maior durabilidade). Esse derivado do ovo tem sido categorizado como matéria-prima para a fabricação de outros produtos; portanto, garantir o controle microbiano é importante para evitar perdas econômicas na indústria e prejuízos na saúde dos consumidores. Os ovo produtos são usados na fabricação de uma variedade de produtos alimentícios, tais como: molhos, massas, biscoitos, bolos, carnes processadas, produtos de peixe, produtos de vinho, sorvetes e sobremesas refrigeradas.

Por outro lado, a sensibilidade térmica das proteínas do ovo requer o uso de temperaturas de pasteurização mais baixas para produtos de ovo líquido, e de temperaturas ligeiramente maiores para ovo inteiro e gema de ovo líquido (Jan et al., 2011). Embora esses tratamentos consigam reduzir a presença da maioria de bactérias patogênicas, são ineficientes ao eliminarem bactérias formadoras de esporos. Existem bactérias psicrófilas formadoras de esporos que

conseguiram persistir até o processo final da cadeia produtiva e resistiram longos tempos à temperatura de refrigeração na estocagem. Tais bactérias conduziram a seleção destes grupos de esporulados e atingiram populações capazes de deteriorar o produto final, produzindo toxinas mesmo a baixas temperaturas (Ribeiro et al., 2018) (Grosset et al., 2007).

É necessário destacar que a contaminação do ovo líquido pasteurizado pode ocorrer de diversas formas, dentre as quais podem ser citadas: a alta contaminação da matéria-prima por uso de ovos provenientes de fornecedores de duvidosa procedência, falha da temperatura e condições no processamento, ineficiente higienização de equipamentos e superfícies determinantes da microbiota residual final e as condições e tempo de refrigeração (estocagem). Esses são alguns dos fatores que podem reduzir o período de vida de prateleira do ovo integral pasteurizado líquido refrigerado (Rêgo et al., 2012).

D. Métodos de caracterização por fingerprinting “genotipagem”

Existem diferenças entre determinadas regiões do genoma que podem expressar-se através de fenótipos ou comportamentos particulares, como a capacidade para resistir ou tolerar condições adversas. Tais diferenças não significam, necessariamente, uma divergência filogenética. Em consequência, linhagens da mesma espécie podem ter um comportamento diferente quando são avaliados para característica funcional. As técnicas fingerprinting permitem obter um perfil genético específico capaz de discriminar populações do mesmo grupo taxonômico.

Entre as principais e mais usadas técnicas de fingerprint temos a Eletroforese em Campo Pulsante (PFGE), considerada técnica *gold standard* em epidemiologia molecular apropriada para separar grandes fragmentos de DNA, por meio da reorientação do DNA em gel pela ação de campos elétricos alternados (Magalhães et al., 2005). Essa técnica é valorizada por sua alta resolução, não só como método genotípico, mas também fenotípico (Miragaia et al., 2002).

O Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) consiste na hidrólise do DNA com enzimas de restrição que vão gerar padrões de restrição específicos. Os perfis resultantes permitem detectar pequenas alterações que diferenciem até em nível de linhagens. O RFLP tem demonstrado ser uma técnica eficiente para estimar a variabilidade genética e a identificação, com altos valores de “bootstrap”, de acordo com os caracteres morfológicos.

A Reação de Amplificação Aleatória de DNA Polimórfico (RAPD-PCR) está baseada na ligação aleatória de sequências arbitrárias de, aproximadamente, 10 nucleotídeos completos em fitas opostas do DNA alvo que darão lugar a diversos fragmentos de tamanho diferentes

(locus diferentes) (Williams et al., 1990). Esses produtos, amplificados, serão visualizados em gel de agarose ou gel de poliacrilamida, dando lugar ao “perfil RAPD”. Uma das vantagens do RAPD é que se trata de uma técnica simples, rápida, de baixo custo e que vai permitir o estudo de espécies sobre as quais não se tem nenhum tipo de informação genética. ORAPD faz uma amostragem mais abrangente do genoma, refletindo regiões repetitivas e de sequência única, regiões codificadoras e não-codificadoras (Lacerda et al., 2002) (Hadrys et al., 1992).

Para a técnica de Ribotipagem, faz-se uso de primers que codificam subunidades 16S e 23S do rRNA. Esses primers são sequências iniciadoras, complementares às sequências conservadas dos genes que codificam as subunidades 16S e 23S do rRNA. Essa região espaçadora (16s rRNA -23S rRNA) difere em número, comprimento e sequência, inclusive para espécies relacionadas evolutivamente próximas. A sequência produto pode apresentar polimorfismo ou variações da sequência de DNA, provavelmente por deleções e inserções que permitiram a discriminação ou diferenciação de cepas relacionadas evolutivamente próximas (grande heterogeneidade dentro dos operões do rRNA). Essa técnica é rápida e simples e possibilita uma análise rápida de um elevado número de linhagens.

A técnica Rep-PCR está baseada no uso de primers sintetizados a partir de sequências repetidas de DNA altamente conservadas e presentes em várias cópias do genoma. Entre as sequências repetitivas usadas estão o REP (Elementos palindrômicos extragênicos repetitivos), as sequências ERIC (Elementos do consenso intergênico repetitivo enterobacteriano), e o elemento BOX. O produto da amplificação dará lugar a regiões genômicas distintas localizadas entre os elementos repetitivos, permitindo a diferenciação em nível de espécies, subespécies e cepa (Rademaker and Bruijn, n.d.) (Moon and Duarte, 2006).

Têm sido desenvolvidos muitos trabalhos usando Gel de Eletroforese de campo pulsante (PFGE) na caracterização genética de bactérias formadoras de esporos, revelando diferenças genéticas entre linhagens do grupo *B. cereus* em diferentes alimentos (Merzougui, 2013) (Amor et al., 2018). Tipagem Sequencial Multilocos é usado, por exemplo, com o fim de revelar a história evolutiva de 53 linhagens de *Bacillus licheniformis* (Madslien et al., 2012), assim como a ferramenta para estudar a estrutura populacional e epidemiológica do grupo *B. cereus* (MLST) (Helgason et al., 2004). Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição (AFLP) mostrou-se muito útil na diferenciação de linhagens de *B. cereus* e, conseqüentemente, no rastreamento por causa de surtos (Zwet et al., 2000). O RAPD já foi usado para avaliar a diversidade intraespecífica de espécies patogênicas de *B. cereus* (Ehling-schulz et al., 2005), bem como ferramenta para discriminar entre bactérias mesófilas e termófilas (Mora et al., 1998).

(Sadiq et al., 2016b). A tipificação de linhagens de *Alicyclobacillus* através do RAPD revelou grande similaridade genética entre linhagens em suco de maracujá (Mcknight et al., 2010).

Com a finalidade de aumentar o poder discriminatório, existem variantes em relação às diferentes técnicas de fingerprinting já mencionadas, como é o caso do ARDRA (Análise de restrição de amplificação de DNA ribossômico) que consiste na amplificação do próprio gene rRNA 16S (rDNA) e subsequente ação de uma enzima de restrição sobre o produto amplificado. Em um estudo genotípico, o ARDRA foi desenvolvido e apresentado como uma técnica alternativa a procedimentos laboratoriais convencionais com o objetivo de identificar e caracterizar a 85 bacillus termofílicos (Mora et al., 1998).

Nos últimos anos, a indústria de alimentos tem implementado diferentes métodos genotípicos e fenotípicos para identificação e classificação de alguns micro-organismos de interesse industrial. Cada um desses métodos permite monitorar ou rastrear populações específicas que podem incluir um gênero, uma espécie ou, inclusive, uma linhagem.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abee, T., Wouters, J.A., 1999. Microbial stress response in minimal processing. *Int. J. Food Microbiol.* 50, 65–91. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(99\)00078-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(99)00078-1)
- Altschul, S.F., 2006. BLAST Algorithm. *Encycl. Life Sci.* 1–5. <https://doi.org/10.1038/npg.els.0005253>
- Alvarenga, V.O., Brancini, G.T.P., Silva, E.K., da Pia, A.K.R., Campagnollo, F.B., Braga, G.Ú.L., Hubinger, M.D., Sant’Ana, A.S., 2018a. Survival variability of 12 strains of *Bacillus cereus* yielded to spray drying of whole milk. *Int. J. Food Microbiol.* 286, 80– 89. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.07.020>
- Alvarenga, V.O., Campagnollo, F.B., Pia, A.K.R., Conceição, D.A., Abud, Y., Sant’Anna, C., Hubinger, M.D., Sant’Ana, A.S., 2018b. Quantifying the responses of three *Bacillus cereus* strains in isothermal conditions and during spray drying of different carrier agents. *Front. Microbiol.* 9, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01113>
- André, S., Vallaëys, T., Planchon, S., 2017. Spore-forming bacteria responsible for food spoilage. *Res. Microbiol.* 168, 379–387. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2016.10.003>
- Aouadhi, C., Maaroufi, A., Mejri, S., 2014. Incidence and characterisation of aerobic spore-forming bacteria originating from dairy milk in Tunisia. *Int. J. Dairy Technol.* 67, 95– 102. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12088>

- Aouadhi, C., Rouissi, Z., Kmiha, S., Mejri, S., Maaroufi, A., 2016. Effect of sporulation conditions on the resistance of *Bacillus sporothermodurans* spores to nisin and heat. **Food Microbiol.** 54, 6–10. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.10.005>
- Apetroaie-Constantin, C., Mikkola, R., Andersson, M.A., Teplova, V., Suominen, I., Johansson, T., Salkinoja-Salonen, M., 2009. *Bacillus subtilis* and *B. mojavensis* strains connected to food poisoning produce the heat stable toxin amyloisin. **J. Appl. Microbiol.** 106, 1976–1985. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04167.x>
- Aragon-Alegro, L.C., Souza, K.L. de O., Costa Sobrinho, P. de S., Landgraf, M., Destro, M.T., 2005. Avaliação da qualidade microbiológica de ovo integral pasteurizado produzido com e sem a etapa de lavagem no processamento. **Ciência e Tecnol. Aliment.** 25, 618–622. <https://doi.org/10.1590/s0101-20612005000300036>
- Asai, K., Takamatsu, H., Iwano, M., Kodama, T., Watabe, K., Ogasawara, N., 2001. The *bacillus subtilis* yabQ gene is essential for formation of the spore cortex. **Microbiology** 147, 919–927. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-4-919>
- Baron F. and Jan S., 2011. Improving the safety and quality of eggs and egg products, Improving the Safety and Quality of Eggs and Egg Products. Woodhead Publishing Limited. <https://doi.org/10.1533/9780857093929>
- Baron, F., Jan, S., 2010. Microbiologie de l'œuf et des ovoproduits. **Prod. Anim.** 23, 193–204. <https://doi.org/10.20870/productions-animales.2010.23.2.3300>
- Baxter, R., Holzapfel, W.H., 1982. A Microbial Investigation of Selected Spices, Herbs, and Additives in South Africa. **J. Food Sci.** 47, 570–574. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1982.tb10125>
- Berendsen, E.M., Boekhorst, J., Kuipers, O.P., Wells-Bennik, M.H.J., 2016a. A mobile genetic element profoundly increases heat resistance of bacterial spores. **ISME J.** 10, 2633–2642. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.59>
- Berendsen, E.M., Boekhorst, J., Kuipers, O.P., Wells-Bennik, M.H.J., 2016b. A mobile genetic element profoundly increases heat resistance of bacterial spores. **ISME J.** 10, 2633–2642. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.59>
- Berendsen, Koning, R.A., Boekhorst, J., Jong, A., Kuipers, O.P., Wells-Bennik, M.H.J., 2016. High-Level Heat Resistance of Spores of *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus licheniformis* Results from the Presence of a spoVA Operon in a Tn 1546 Transposon Bacterial Strains Used in This Study 7, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01912>

Berthold-Pluta, Pluta, Garbowska, Stefańska, 2019. Prevalence and toxicity characterization of *Bacillus cereus* in food products from Poland. **Foods** 8, 269. <https://doi.org/10.3390/foods8070269>

Bilung, L.M., Tahar, A.S., Shze, T.P., Jamie, S.V.F.A., Hashim, H.F., Apun, K., Radu, S., 2016. Enumeration and molecular detection of *Bacillus cereus* in local indigenous and imported rice grains. **Agric. Food Secur.** 5, 4–8. <https://doi.org/10.1186/s40066-016-0074-4>

Biosystems, A., 2002. BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. **Plant Mol. Biol. Report.** 20, 187–187. <https://doi.org/10.1007/BF02799434>

Blakey, L.J., Prlestdt, F.G., 1980. The Occurrence of *Bacillus cereus* in some Dried Foods Including Pulses and Cereals.

Braja, D., 2012. Processamento, pasteurização, desidratação e outros processos similares de conservação de ovos de consumo. 39–37, 66 עלון הנוטע.

Bukowska-Faniband, E., 2015. On the role of penicillin-binding protein SpoVD in endospore cortex assembly.

Bukowska-Faniband, E., Hederstedt, L., 2017. Transpeptidase activity of penicillin-binding protein SpoVD in peptidoglycan synthesis conditionally depends on the disulfide reductase StoA. **Mol. Microbiol.** 105, 98–114. <https://doi.org/10.1111/mmi.13689>

Bukowska-Faniband, E., Hederstedt, L., 2013. Cortex synthesis during *Bacillus subtilis* sporulation depends on the transpeptidase activity of SpoVD. **FEMS Microbiol. Lett.** 346, 65–72. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12202>

Burgess, S.A., Lindsay, D., Flint, S.H., 2010a. Thermophilic bacilli and their importance in dairy processing. **Int. J. Food Microbiol.** 144, 215–225. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.09.027>

Burgess, S.A., Lindsay, D., Flint, S.H., 2010b. Thermophilic bacilli and their importance in dairy processing. **Int. J. Food Microbiol.** <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.09.027>

Carlin, F., Nguyen-The, C., 2013. Pathogen update: *Bacillus* species, *Advances in Microbial Food Safety*. Woodhead Publishing Limited. <https://doi.org/10.1533/9780857098740.2.70>

Checinska, A., Paszczynski, A., Burbank, M., 2015. *Bacillus* and Other Spore-Forming Genera: Variations in Responses and Mechanisms for Survival. **Annu. Rev. Food Sci. Technol.** 6, 351–369. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030713-092332>

Clarridge, J.E., 2004. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. **Clin. Microbiol. Rev.** 17, 840–

862. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.4.840-862.2004>

Coleman, W.H., Chen, D., Li, Y.Q., Cowan, A.E., Setlow, P., 2007. How moist heat kill spores of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 189, 8458–8466. <https://doi.org/10.1128/JB.01242-07>

Cortês, M., Fuchs, F.M., Commichau, F.M., Eichenberger, P., Schuerger, A.C., Nicholson, W.L., Setlow, P., Moeller, R., 2019. *Bacillus subtilis* spore resistance to simulated mars surface conditions. **Front. Microbiol.** 10, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00333>

Dark, M.J., 2013. Whole-genome sequencing in bacteriology: State of the art. **Infect. Drug Resist.** 6, 115–122. <https://doi.org/10.2147/IDR.S35710>

Den Besten, H.M.W., Berendsen, E.M., Wells-Bennik, M.H.J., Straatsma, H., Zwietering, M.H., 2017. Two complementary approaches to quantify variability in heat resistance of spores of *Bacillus subtilis*. *Int. J. Food Microbiol.* <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.04.014>

Driks, A., Setlow, P., 2014. Morphogenesis and Properties of the Bacterial Spore. **Prokaryotic Dev.** 191–218. <https://doi.org/10.1128/9781555818166.ch9>

Duc, L.H., Dong, T.C., Logan, N.A., Sutherland, A.D., Taylor, J., Cutting, S.M., 2005. Cases of emesis associated with bacterial contamination of an infant breakfast cereal product. **Int. J. Food Microbiol.** 102, 245–251. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.11.022>

EFSA, 2014. Scientific Opinion on the public health risks of table eggs due to deterioration and development of pathogens. **EFSA J.** 12, 3782. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3782>

Ehling-Schulz, M., Lereclus, D., Koehler, T.M., 2019. The *Bacillus cereus* Group: *Bacillus* Species with Pathogenic Potential, Microbiology Spectrum. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.gpp3-0032-2018>

Eichenberger, P., Fujita, M., Jensen, S.T., Conlon, E.M., Rudner, D.Z., Wang, S.T., Ferguson, C., Haga, K., Sato, T., Liu, J.S., Losick, R., 2004. The program of gene transcription for a single differentiating cell type during sporulation in *Bacillus subtilis*. **PLoS Biol.** 2. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020328>

Eichenberger, P., Jensen, S.T., Conlon, E.M., Van Ooij, C., Silvaggi, J., González-Pastor, J.E., Fujita, M., Ben-Yehuda, S., Stragier, P., Liu, J.S., Losick, R., 2003. The σ^E regulon and the identification of additional sporulation genes in *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.* 327, 945–972. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(03\)00205-5](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(03)00205-5)

- Fabret, C., Feher, V.A., Hoch, J.A., 1999. Two-component signal transduction in *Bacillus subtilis*: How one organism sees its world. **J. Bacteriol.** 181, 1975–1983. <https://doi.org/10.1128/jb.181.7.1975-1983.1999>
- Felsenstein, J., 1985. CONFIDENCE LIMITS ON PHYLOGENIES: AN APPROACH USING THE BOOTSTRAP. **Evolution** (N. Y). 39, 783–791. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x>
- Fogele, B., Granta, R., Valciņa, O., Bērziņš, A., 2018. Occurrence and diversity of *Bacillus cereus* and moulds in spices and herbs. **Food Control** 83, 69–74. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.05.038>
- From, C., Pukall, R., Schumann, P., Granum, P.E., 2005. Toxin-Producing Ability among. **Society** 71, 1178–1183. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.3.1178>
- Garde, S., Brea, L., Torres, N.G., Arribas, M.Á., 2018. Spore - forming bacteria in dairy products.
- Goulart M. C., Cueva L.G., Attili D., F.F., 2019. Microbial Probiotics for Agricultural Systems, in: Zúñiga-Dávila, D., González-Andrés, F., Ormeño-Orrillo, E. (Eds.), Sustainability in Plant and Crop Protection. **Springer International Publishing**, Cham. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-17597-9>
- Grosset, L., Baron, F., Cochet, O., Briandet, R., Dessaigne, S., Chevalier, S.E.V., Gautier, M., Jan, S., 2007. Isolation and Characterization of a Psychrotolerant Toxin Producer, *Bacillus weihenstephanensis*, in Liquid Egg Products 70, 2782–2791.
- Guinebretière, 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., 2013. *Bacillus cytotoxicus* sp. nov. is a novel thermotolerant species of the *Bacillus cereus* group occasionally associated with food poisoning. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 63, 31–40. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.030627-0>
- Gupta, R.S., Bustard, K., Falah, M., Singh, D., 1997. Sequencing of heat shock protein 70 (DnaK) homologs from *Deinococcus proteolyticus* and *Thermomicrobium roseum* and their integration in a protein- based phylogeny of prokaryotes. **J. Bacteriol.** 179, 345– 357. <https://doi.org/10.1128/jb.179.2.345-357.1997>
- Hackett, R.H., Setlow, P., 1988. Properties of spores of *Bacillus subtilis* strains which lack the

- major small, acid-soluble protein. **J. Bacteriol.** 170, 1403–1404. <https://doi.org/10.1128/jb.170.3.1403-1404.1988>
- Hara-Kudo, Y., Takatori, K., 2009. Microbial quality of liquid egg and salmonella infection status in Japan. **J. Food Hyg. Soc. Japan** 50, 34–40. <https://doi.org/10.3358/shokueishi.50.34>
- He, K., Xin, Y. ping, Shan, Y., Zhang, X., Song, H. hui, Fang, W. huan, 2019. Phosphorylation residue T175 in RsbR protein is required for efficient induction of sigma B factor and survival of *Listeria monocytogenes* under acidic stress. **J. Zhejiang Univ. Sci. B** 20, 660–669. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1800551>
- Hecker, M., Schumann, W., Volker, U., 1996. Heat-shock and general stress response in *Bacillus subtilis*: DISCOVER: all subjects. **Mol. Microbiol.** 19, 417–428.
- Henriques, A.O., Moran, C.P., 2007. Structure, Assembly, and Function of the Spore Surface Layers. **Annu. Rev. Microbiol.** 61, 555–588. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.61.080706.093224>
- Heyndrickx, M., Scheldeman, P., 2008. Bacilli Associated with Spoilage in Dairy Products and Other Food. **Appl. Syst. Bacillus Relat.** 64–82. <https://doi.org/10.1002/9780470696743.ch6>
- Hong, H.A., To, E., Fakhry, S., Baccigalupi, L., Ricca, E., Cutting, S.M., 2009. Defining the natural habitat of *Bacillus* spore-formers. **Res. Microbiol.** 160, 375–379. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2009.06.006>
- Iciek, J., Papiewska, A., Molska, M., 2006. Inactivation of *Bacillus stearothermophilus* spores during thermal processing. **J. Food Eng.** 77, 406–410. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.07.005>
- Idris, A.B., Hassan, H.G., Salaheldin Ali, M.A., Eltaher, S.M., Idris, L.B., Altayb, H.N., Abass, A.M., Ibrahim, M.M.A., Ibrahim, E.A.M., Hassan, M.A., 2020. Molecular Phylogenetic Analysis of 16S rRNA Sequences Identified Two Lineages of *Helicobacter pylori* Strains Detected from Different Regions in Sudan Suggestive of Differential Evolution. **Int. J. Microbiol.** 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/8825718>
- Ifeoma, M.E., Onyekachi, O., 2013. Influence of incubation temperature, pH and food substrate on production of *Bacillus cereus* extracellular proteins and toxins. **African J. Microbiol. Res.** 7, 2050–2056. <https://doi.org/10.5897/ajmr12.1428>
- James, C., Lechevalier, V., Ketteringham, L., 2002. Surface pasteurisation of shell eggs. **J. Food Eng.** 53, 193–197. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(01\)00156-X](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(01)00156-X)
- Jan, S., Brunet, N., Techer, C., Le Maréchal, C., Koné, A.Z., Grosset, N., Cochet, M.F., Gillard,

- A., Gautier, M., Puterflam, J., Baron, F., 2011. Biodiversity of psychrotrophic bacteria of the *Bacillus cereus* group collected in farm and egg product industry. **Food Microbiol.** 28, 261–265. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.05.029>
- Keerthirathne, T.P., Ross, K., Fallowfield, H., Whiley, H., 2017. Reducing risk of salmonellosis through egg decontamination processes. **Int. J. Environ. Res. Public Health** 14. <https://doi.org/10.3390/ijerph14030335>
- Khaneja, R., Perez-Fons, L., Fakhry, S., Baccigalupi, L., Steiger, S., To, E., Sandmann, G., Dong, T.C., Ricca, E., Fraser, P.D., Cutting, S.M., 2010. Carotenoids found in *Bacillus*. **J. Appl. Microbiol.** 108, 1889–1902. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04590.x>
- Ki, S.L., Bumbaca, D., Kosman, J., Setlow, P., Jedrzejewski, M.J., 2008. Structure of a protein-DNA complex essential for DNA protection in spores of *Bacillus* species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 2806–2811. <https://doi.org/10.1073/pnas.0708244105>
- Kim, O.S., Cho, Y.J., Lee, K., Yoon, S.H., Kim, M., Na, H., Park, S.C., Jeon, Y.S., Lee, J.H., Yi, H., Won, S., Chun, J., 2012. Introducing EzTaxon-e: A prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 62, 716–721. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.038075-0>
- Kock, H., Hecker, M., 2004. Fine-Tuning in Regulation of Clp Protein Content in. **Society** 186, 179–191. <https://doi.org/10.1128/JB.186.1.179>
- Kone, A.Z., Jan, S., Le Marechal, C., Grosset, N., Gautier, M., Puterflam, J., Baron, F., 2013a. Identifying risk factors for eggshell contamination by *Bacillus cereus* group bacteria in French laying farms. **Br. Poult. Sci.** 54, 298–305. <https://doi.org/10.1080/00071668.2013.783900>
- Kone, A.Z., Jan, S., Le Marechal, C., Grosset, N., Gautier, M., Puterflam, J., Baron, F., 2013b. Identifying risk factors for eggshell contamination by *Bacillus cereus* group bacteria in French laying farms. **Br. Poult. Sci.** 54, 298–305. <https://doi.org/10.1080/00071668.2013.783900>
- Kort, R., O'Brien, A.C., van Stokkum, I.H.M., Oomes, S.J.C.M., Crielaard, W., Hellingwerf, K.J., Brul, S., 2005. Assessment of heat resistance of bacterial spores from food product isolates by fluorescence monitoring of dipicolinic acid release. **Appl. Environ. Microbiol.** 71, 3556–64. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.7.3556-3564.2005>
- Kru, E., Hecker, M., 1998. Encodes a Negative Regulator of Its Own Operon and Other Class III Heat Shock Genes. **Society** 180, 6681–6688.
- Krüger, E., Hecker, M., 1998. Ctsr Operon Paper 180, 6681–6688.

- Krüger, E., Völker, U., Hecker, M., 1994. Stress induction of *clpC* in *Bacillus subtilis* and its involvement in stress tolerance. **J. Bacteriol.** 176, 3360–3367. <https://doi.org/10.1128/JB.176.11.3360-3367.1994>
- Kumar, M., Prasanna, R., Lone, S., Padaria, J.C., Saxena, A.K., 2014. Cloning and expression of *dnaK* gene from *Bacillus pumilus* of hot water spring origin. **Appl. Transl. Genomics** 3, 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.atg.2013.10.001>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K., 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Mol. Biol. Evol.** 35, 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Kuwana, R., Yamamura, S., Ikejiri, H., Kobayashi, K., Ogasawara, N., Asai, K., Sadaie, Y., Takamatsu, H., Watabe, K., 2003. *Bacillus subtilis* spoVIF (*yjcC*) gene, involved in coat assembly and spore resistance. **Microbiology** 149, 3011–3021. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26432-0>
- Lavermicocca, P., Valerio, F., De Bellis, P., Sisto, A., Leguérinel, I., 2016. Sporeforming bacteria associated with bread production: Spoilage and toxigenic potential. **Food Hyg. Toxicol. Ready-to-Eat Foods** 275–293. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801916-0.00016-9>
- Lee, J.K., Movahedi, S., Harding, S.E., Waites, W.M., 2003. The effect of acid shock on sporulating *Bacillus subtilis* cells. **J. Appl. Microbiol.** 94, 184–190. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01816.x>
- Leuschner, R.G.K., Lillford, P.J., 2000. Effects of hydration on molecular mobility in phase-bright *Bacillus subtilis* spores. **Microbiology** 146, 49–55. <https://doi.org/10.1099/00221287-146-1-49>
- Leyva-Illades, J.F., Setlow, B., Sarker, M.R., Setlow, P., 2007. Effect of a small, acid-soluble spore protein from *Clostridium perfringens* on the resistance properties of *Bacillus subtilis* spores. **J. Bacteriol.** 189, 7927–7931. <https://doi.org/10.1128/JB.01179-07>
- Li, Y., Davis, A., Korza, G., Zhang, P., Li, Y.Q., Setlow, B., Setlow, P., Hao, B., 2012. Role of a SpoVA Protein in Dipicolinic Acid Uptake into Developing Spores of *Bacillus subtilis*. **J. Bacteriol.** 194, 1875–1884. <https://doi.org/10.1128/JB.00062-12>
- Liang, W.C., Wang, X.H., Lin, M.G., Lin, L.L., 2009. A 70-kDa molecular chaperone, DnaK, from the industrial bacterium *Bacillus licheniformis*: Gene cloning, purification and molecular characterization of the recombinant protein. **Indian J. Microbiol.** 49, 151–160. <https://doi.org/10.1007/s12088-009-0029-6>

- Lindbäck, T., Granum, P.E., 2008. Detection and Purification of *Bacillus cereus* Enterotoxins, in: Food-Borne Pathogens. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 15–26. <https://doi.org/10.1385/1-59259-990-7:015>
- Liu, Y., Lai, Q., Dong, C., Sun, F., Wang, L., Li, G., Shao, Z., 2013. Phylogenetic diversity of the *Bacillus pumilus* group and the marine ecotype revealed by multilocus sequence analysis. **PLoS One** 8, 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080097>
- Lorenz, T.C., 2012. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. **J. Vis. Exp.** 1–15. <https://doi.org/10.3791/3998>
- Lowe, T., Sharefkin, J., Yang, S.Q., Dieffenbach, C.W., 1990. A computer program for selection of oligonucleotide primers for polymerase chain reactions. **Nucleic Acids Res.** 18, 1757–1761. <https://doi.org/10.1093/nar/18.7.1757>
- Lv, R., Zou, M., Chantapakul, T., Chen, W., Muhammad, A.I., Zhou, J., Ding, T., Ye, X., Liu, D., 2019. Effect of ultrasonication and thermal and pressure treatments, individually and combined, on inactivation of *Bacillus cereus* spores. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 103, 2329–2338. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9559-3>
- Markland, S.M., Farkas, D.F., Kniel, K.E., Hoover, D.G., 2013. Pathogenic psychrotolerant sporeformers: An emerging challenge for low-temperature storage of minimally processed foods. **Foodborne Pathog. Dis.** 10, 413–419. <https://doi.org/10.1089/fpd.2012.1355>
- Markland, S.M., Hoover, D.G., 2016. *Bacillus cereus* Mechanisms of Resistance to Food Processing, The Diverse Faces of *Bacillus cereus*. **Elsevier Inc.** <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-801474-5.00004-9>
- Martinez, L., Reeves, A., Haldenwang, W., 2010. Stressosomes formed in *Bacillus subtilis* from the RsbR protein of *Listeria monocytogenes* allow σ B activation following exposure to either physical or nutritional stress. **J. Bacteriol.** 192, 6279–6286. <https://doi.org/10.1128/JB.00467-10>
- Martinez, R.C.R., Alvarenga, V.O., Thomazini, M., Fávoro-Trindade, C.S., Sant’Ana, A. deS., 2016. Assessment of the inhibitory effect of free and encapsulated commercial nisin (Nisaplin®), tested alone and in combination, on *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus* in refrigerated milk. **LWT - Food Sci. Technol.** 68, 67–75. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.12.027>
- Mckenney, P.T., Driks, A., Eichenberger, P., 2013. The *Bacillus subtilis* endospore: Assembly and functions of the multilayered coat. **Nat. Rev. Microbiol.** 11, 33–44.

<https://doi.org/10.1038/nrmicro2921>

Mechanisms, D., Sporulation, R., Factor, S., 2016. in the Firmicutes 88–95.

<https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.01.006.Diverse>

Melly, E., Genest, P.C., Gilmore, M.E., Little, S., Popham, D.L., Driks, A., Setlow, P., 2002.

Analysis of the properties of spores of *Bacillus subtilis* prepared at different temperatures. **J. Appl. Microbiol.** 92, 1105–1115. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01644.x>

Ministry of Agriculture, L. and S., 1991. Padrão de identidade e qualidade para ovo integral (Regulation of identity and quality for whole eggs) 8, 55.

Montanhini, M.T.M., dos Santos Bersot, L., 2013. Avaliação do comportamento psicrotrófico e atividade lipolítica e proteolítica de *Bacillus cereus* isolado de produtos lácteos refrigerados.

Acta Sci. - Technol. 35, 163–167. <https://doi.org/10.4025/actascitechnol.v35i1.13752>

Movahedi, S., Waites, W., 2002. Cold shock response in sporulating *Bacillus subtilis* and its effect on spore heat resistance. **J. Bacteriol.** 184, 5275–5281.

<https://doi.org/10.1128/JB.184.19.5275-5281.2002>

Movahedi, S., Waites, W., 2000. A two-dimensional protein gel electrophoresis study of the heat stress response of *bacillus subtilis* cells during sporulation. **J. Bacteriol.** 182, 4758–4763.

<https://doi.org/10.1128/JB.182.17.4758-4763.2000>

Nakano, M., 2018. Multiplex PCR for rapid detection of thermophilic *Moorella thermoacetica* and *Geobacillus stearothermophilus* from canned foods and beverages. **Int. J. Food Sci. Technol.** 53, 1352–1362.

<https://doi.org/10.1111/ijfs.13691>

Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol. Biol. Evol.** 4, 406–425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>

Nicholson, W. L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H.J., Setlow, P., 2000. Resistance of *Bacillus* Endospores to Extreme Terrestrial and Extraterrestrial Environments. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 64, 548–572.

<https://doi.org/10.1128/membr.64.3.548-572.2000>

Noor, R., Tabassum, N., Maniha, S.M., Tabassum, T., 2019. Stress Responses Within *Bacillus* Species Under Heat Shock. 2, 148–153. <https://doi.org/10.31080/ASMI.2019.02.0316>

Oliveira, R.B.A., Lopes, L.S., Baptista, R.C., Chinha, A.A.I.A., Portela, J.B., Nascimento, J.S., Costa, L.E.O., Cruz, A.G., Sant’Ana, A.S., 2018. Occurrence, populations, diversity, and growth potential of spore-forming bacteria in “requeijão cremoso.” **LWT -Food Sci. Technol.** 89, 24–31.

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.10.029>

- Oliveira, R.B.A., Margalho, L.P., Nascimento, J.S., Costa, L.E.O., Portela, J.B., Cruz, A.G., Sant'Ana, A.S., 2016. Processed cheese contamination by spore-forming bacteria: A review of sources, routes, fate during processing and control. **Trends Food Sci. Technol.** <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.09.008>
- Oomes, S.J.C.M., van Zuijlen, A.C.M., Hehenkamp, J.O., Witsenboer, H., van der Vossen, J.M.B.M., Brul, S., 2007. The characterisation of *Bacillus* spores occurring in the manufacturing of (low acid) canned products. **Int. J. Food Microbiol.** 120, 85–94. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.06.013>
- Orsburn, B., Sucre, K., Popham, D.L., Melville, S.B., 2009. The SpmA/B and DacF proteins of *Clostridium perfringens* play important roles in spore heat resistance: Research Letter. **FEMS Microbiol. Lett.** 291, 188–194. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01454.x>
- Paidhungat, M., Setlow, B., Driks, A., Setlow, P., 2000. Characterization of spores of *Bacillus subtilis* which lack dipicolinic acid. **J. Bacteriol.** 182, 5505–5512. <https://doi.org/10.1128/JB.182.19.5505-5512.2000>
- Paredes-Sabja, D., Sarker, N., Setlow, B., Setlow, P., Sarker, M.R., 2008. Roles of DacB and Spm proteins in *Clostridium perfringens* spore resistance to moist heat, chemicals, and UV radiation. **Appl. Environ. Microbiol.** 74, 3730–3738. <https://doi.org/10.1128/AEM.00169-08>
- Patagundi, B.I., Shivasharan, C.T., Kaliwal, B.B., 2011. Isolation and Characterization of Pretense Producing Bacteria from Soil. **J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.** 31, 754–759. <https://doi.org/10.3746/jkfn.2002.31.5.754>
- Peña, W.E.L., de Andrade, N.J., Soares, N.F.F., Alvarenga, V.Ô.O., Rodrigues Junior, S., Granato, D., Giraldo Zuniga, A.D., de Souza Sant'Ana, A., 2014. Modelling *Bacillus cereus* adhesion on stainless steel surface as affected by temperature, pH and time. **Int. Dairy J.** 34, 153–158. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.08.006>
- Pereira, A.P.M., Sant'Ana, A.S., 2018a. Diversity and fate of spore forming bacteria in cocoa powder, milk powder, starch and sugar during processing: A review. **Trends Food Sci. Technol.** <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.04.005>
- Pereira, A.P.M., Sant'Ana, A.S., 2018b. Diversity and fate of spore forming bacteria in cocoa powder, milk powder, starch and sugar during processing: A review. **Trends Food Sci. Technol.** <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.04.005>
- Perez-Valdespino, A., Li, Y., Setlow, B., Ghosh, S., Pan, D., Korza, G., Feeherry, F.E., Doona,

- C.J., Li, Y.Q., Hao, B., Setlow, P., 2014. Function of the SpoVAEa and SpoVAF proteins of *Bacillus subtilis* spores. **J. Bacteriol.** 196, 2077–2088. <https://doi.org/10.1128/JB.01546-14>
- Periago, P.M., Periago, P.M., Abee, T., Abee, T., Wouters, J. a, Wouters, J. a, 2002. Identification of Proteins Involved in the Heat Stress Response of. **Society** 68, 3486–3495. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.7.3486>
- Phillips, J.L., Gnanakaran, S., 2015. A data-driven approach to modeling the tripartite structure of multidrug resistance efflux pumps. *Proteins Struct. Funct.* **Bioinforma.** 83, 46–65. <https://doi.org/10.1002/prot.24632>
- Pia, A.K.R., Pereira, A.P.M., Costa, R.A., Alvarenga, V.O., Freire, L., Carlin, F., Sant’Ana, A.S., 2019. The fate of *Bacillus cereus* and *Geobacillus stearothermophilus* during alkalization of cocoa as affected by alkali concentration and use of pre-roasted nibs. **Food Microbiol.** 82, 99–106. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.01.009>
- Piggot, P.J., 2004. Microbial development. **Trends Genet.** 1, 265. [https://doi.org/10.1016/0168-9525\(85\)90098-8](https://doi.org/10.1016/0168-9525(85)90098-8)
- Piggot, P.J., Hilbert, D.W., 2004. Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Curr. Opin. Microbiol.* 7, 579–586. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2004.10.001>
- POPHAM, D., ILLADES-AGUIAR, B., SETLOW, P., 1995. The *Bacillus subtilis* *dacB* gene, encoding penicillin-binding protein 5*, is part of a three-gene operon required for proper spore cortex synthesis and spore core dehydration. **J. Bacteriol.** 177, 4721–4729. <https://doi.org/10.1128/jb.177.16.4721-4729.1995>
- Popham, D.L., Gilmore, M.E., Setlow, P., 1999. Roles of low-molecular-weight penicillin-binding proteins in *Bacillus subtilis* spore peptidoglycan synthesis and spore properties. **J. Bacteriol.** 181, 126–132.
- Popham, D.L., Illades-Aguiar, B., Setlow, P., 1995. The *Bacillus subtilis* *dacB* gene, encoding penicillin-binding protein 5*, is part of a three-gene operon required for proper spore cortex synthesis and spore core dehydration. **J. Bacteriol.** 177, 4721–4729. <https://doi.org/10.1128/jb.177.16.4721-4729.1995>
- Portnoy, B.L., Goepfert, J.M., Harmon, S.M., 1976. An outbreak of *Bacillus cereus* food poisoning resulting from contaminated vegetablesprouts. **Am. J. Epidemiol.** 103, 589–594. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a112263>
- Postollec, F., Mathot, A.G., Bernard, M., Divanac’h, M.L., Pavan, S., Sohier, D., 2012a.

- Tracking spore-forming bacteria in food: From natural biodiversity to selection by processes. **Int. J. Food Microbiol.** 158, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.004>
- Rabinowitz, P.M., Conti, L.A., 2010. Foodborne illness, 1st ed, Human-Animal Medicine. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-6837-2.00011-7>
- Raeymaekers, L., Wuytack, E.Y., Willems, I., Michiels, C.W., Wuytack, F., 2002. Expression of a P-type Ca^{2+} -transport ATPase in *Bacillus subtilis* during sporulation. *Cell Calcium*
- Raju, D., Waters, M., Setlow, P., Sarker, M.R., 2006. Investigating the role of small, acid-soluble spore proteins (SASPs) in the resistance of *Clostridium perfringens* spores to heat. **BMC Microbiol.** 6, 1–13. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-6-50>
- Ramirez-Peralta, A., Stewart, K.A. V., Thomas, S.K., Setlow, B., Chen, Z., Li, Y.Q., Setlow, P., 2012a. Effects of the SpoVT regulatory protein on the germination and germination protein levels of spores of *Bacillus subtilis*. **J. Bacteriol.** 194, 3417–3425. <https://doi.org/10.1128/JB.00504-12>
- Ramirez-Peralta, A., Zhang, P., Li, Y. qing, Setlow, P., 2012b. Effects of sporulation conditions on the germination and germination protein levels of *Bacillus subtilis* spores. **Appl. Environ. Microbiol.** 78, 2689–2697. <https://doi.org/10.1128/AEM.07908-11>
- Ranawat, P., Rawat, S., 2017. Stress response physiology of thermophiles. **Arch. Microbiol.** 199, 391–414. <https://doi.org/10.1007/s00203-016-1331-4>
- Raso, J., Barbosa-Cánovas, G. V., 2003. Nonthermal Preservation of Foods Using Combined Processing Techniques. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 43, 265–285. <https://doi.org/10.1080/10408690390826527>
- Reder, A., Höper, D., Gerth, U., Hecker, M., 2012. Contributions of individual σ B-dependent general stress genes to oxidative stress resistance of *Bacillus subtilis*. **J. Bacteriol.** 194, 3601–3610. <https://doi.org/10.1128/JB.00528-12>
- Réhault-Godbert, S., Guyot, N., Nys, Y., 2019. The golden egg: Nutritional value, bioactivities, and emerging benefits for human health. **Nutrients** 11, 1–26. <https://doi.org/10.3390/nu11030684>
- Remize, F., 2016. Spore-Forming Bacteria, The Microbiological Quality of Food: Foodborne Spoilers. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100502-6.00007-8>
- Rey, M.W., Ramaiya, P., Nelson, B.A., Brody-Karpin, S.D., Zaretsky, E.J., Tang, M.,

- Lopez de Leon, A., Xiang, H., Gusti, V., Clausen, I.G., Olsen, P.B., Rasmussen, M.D., Andersen, J.T., Jørgensen, P.L., Larsen, T.S., Sorokin, A., Bolotin, A., Lapidus, A., Galleron, N., Ehrlich, S.D., Berka, R.M., 2004. Complete genome sequence of the industrial bacterium *Bacillus licheniformis* and comparisons with closely related *Bacillus* species. **Genome Biol.** 5. <https://doi.org/10.1186/gb-2004-5-10-r77>
- Ribeiro, J.C., Tamanini, R., Soares, B.F., De Oliveira, A.M., De Godoi Silva, F., Da Silva, F.F., Augusto, N.A., Beloti, V., 2016. Efficiency of boiling and four other methods for genomic DNA extraction of deteriorating spore-forming bacteria from milk. **Semin.Agrar.** 37, 3069–3078. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2016v37n5p3069>
- Ronimus, R.S., Parker, L.E., Morgan, H.W., Mesophilic, B., 1997. The utilization of RAPD-PCR for identifying thermophilic and mesophilic *Bacillus* species applied only to the following *Bacillus* species: *Bacil*-. **FEMS Microbiol. Lett.** 147, 75–79.
- Rönner, U., Husmark, U., Henriksson, A., 1990. Adhesion of *Bacillus* spores in relation to hydrophobicity. **J. Appl. Bacteriol.** 69, 550–556. <https://doi.org/10.1111/j.13652672.1990.tb01547.x>
- Rueckert, A., Ronimus, R.S., Morgan, H.W., 2005. Development of a rapid detection and enumeration method for thermophilic bacilli in milk powders. **J. Microbiol. Methods** 60, 155–167. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2004.09.008>
- Russell, A.D., 1990a. Bacterial spores and chemical sporicidal agents. **Clin. Microbiol. Rev.** 3, 99–119. <https://doi.org/10.1128/CMR.3.2.99>
- Sadiq, F.A., Flint, S., He, G.Q., 2018a. Microbiota of milk powders and the heat resistance and spoilage potential of aerobic spore-forming bacteria. **Int. Dairy J.** 85, <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.06.003>
- Sadiq, F.A., Flint, S., He, G.Q., 2018b. Microbiota of milk powders and the heat resistance and spoilage potential of aerobic spore-forming bacteria. **Int. Dairy J.** 85, 159–168. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.06.003>
- Sadiq, F.A., Li, Y., Liu, T.J., Flint, S., Zhang, G., Yuan, L., Pei, Z., He, G.Q., 2016a. The heat resistance and spoilage potential of aerobic mesophilic and thermophilic spore forming bacteria isolated from Chinese milk powders. **Int. J. Food Microbiol.** <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.09.009>
- Sadiq, F.A., Li, Y., Liu, T.J., Flint, S., Zhang, G., Yuan, L., Pei, Z., He, G.Q., 2016b. The heat resistance and spoilage potential of aerobic mesophilic and thermophilic spore forming bacteria

- isolated from Chinese milk powders. **Int. J. Food Microbiol.** 238, 193–201. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.09.009>
- Salkinoja-Salonen, M.S., Vuorio, R., Andersson, M.A., Kämpfer, P., Andersson, M.C., Honkanen-Buzalski, T., Scoging, A.C., 1999. Toxigenic strains of *Bacillus licheniformis* related to food poisoning. **Appl. Environ. Microbiol.** 65, 4637–4645.
- Scheffers, D.J., 2005a. Dynamic localization of penicillin binding proteins during spore development in *Bacillus subtilis*. **Microbiology** 151, 999–1012. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27692-0>
- Scheffers, D.J., 2005b. Dynamic localization of penicillin-binding proteins during spore development in *Bacillus subtilis*. **Microbiology** 151, 999–1012. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27692-0>
- Scheldeman, P., Herman, L., Foster, S., Heyndrickx, M., 2006. *Bacillus sporothermodurans* and other highly heat-resistant spore formers in milk. **J. Appl. Microbiol.** 101, 542–555. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02964.x>
- Schneider, K.R., Parish, M.E., Goodrich, R.M., Cookingham, T., 2004. Preventing Foodborne Illness: *Bacillus cereus* and *Bacillus anthracis*. **Univ. Florida** 1–5.
- Selby, K., Lindström, M., Somervuo, P., Heap, J.T., Minton, N.P., Korkeala, H., 2011. Important role of class I heat shock genes *hrcA* and *dnaK* in the heat shock response and the response to pH and NaCl stress of group I *Clostridium botulinum* strain ATCC 3502. **Appl. Environ. Microbiol.** 77, 2823–2830. <https://doi.org/10.1128/AEM.02633-10>
- Setlow, P., 2014. Spore Resistance Properties 1–14. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec>
- Setlow, P., 2006. Spores of *Bacillus subtilis*: Their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. **J. Appl. Microbiol.** 101, 514–525. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02736.x>
- Setlow, P., 1994. Mechanisms which contribute to the long-term survival of spores of *Bacillus* species. **J. Appl. Bacteriol.** 76, 49S–60S. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1994.tb04357.x>
- Setlow, P., Johnson, E.A., 2019. Spores and Their Significance. **Food Microbiology**. <https://doi.org/10.1128/9781555819972.ch2>
- Sharma, A., Satyanarayana, T., 2013. Comparative genomics of *Bacillus* species and its relevance in industrial microbiology. **Genomics Insights** 6, 25–36. <https://doi.org/10.4137/GEI.S12732>

- Singh, L.K., Dhasmana, N., Sajid, A., Kumar, P., Bhaduri, A., Bharadwaj, M., Gandotra, S., Kalia, V.C., Das, T.K., Goel, A.K., Pomerantsev, A.P., Misra, R., Gerth, U., Leppla, S.H., Singh, Y., 2015. *clpC* operon regulates cell architecture and sporulation in *Bacillus anthracis*. **Environ. Microbiol.** 17, 855–865. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12548>
- Singh, M., Brar, J., 2016. Egg Safety in the Realm of Preharvest Food Safety. **Microbiol. Spectr.** 4, 1–14. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.pfs-0005-2014>
- Singh, O. V., 2017. The Problem of Spore - Forming Bacteria in Food Preservation and Tentative Solutions Spore Structure and Associated Mechanisms of Resistance Metabolic State of the Spore 139–151.
- Soni, A., Oey, I., Silcock, P., Bremer, P., 2016. Bacillus Spores in the Food Industry: A Review on Resistance and Response to Novel Inactivation Technologies. **Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.** 15, 1139–1148. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12231>
- Soni, A., Oey, I., Silcock, P., Bremer, P.J., 2018. Impact of temperature, nutrients, pH and cold storage on the germination, growth and resistance of *Bacillus cereus* spores in eggwhite. **Food Res. Int.** 106, 394–403. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.01.006>
- Stephenson, K., Yamaguchi, Y., Hoch, J.A., 2000. The mechanism of action of inhibitors of bacterial two-component signal transduction systems. **J. Biol. Chem.** 275, 38900–38904. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006633200>
- Stevenson, K.E., Lembke, F., 2015. 23. Mesophilic Aerobic Endospore-Forming Bacilli, in: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. **American Public Health Association.** <https://doi.org/10.2105/MBEF.0222.028>
- Stewart, G.C., 2015. The Exosporium Layer of Bacterial Spores: a Connection to the Environment and the Infected Host. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 79, 437–457. <https://doi.org/10.1128/mmb.00050-15>
- Stoeckel, M., Lücking, G., Ehling-Schulz, M., Atamer, Z., Hinrichs, J., 2016. Bacterial spores isolated from ingredients, intermediate and final products obtained from dairies: thermal resistance in milk. **Dairy Sci. Technol.** 96, 569–577. <https://doi.org/10.1007/s13594-016-0279-0>
- Sunde, E.P., Setlow, P., Hederstedt, L., Halle, B., 2009. The physical state of water in bacterial spores. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 106, 19334–19339. <https://doi.org/10.1073/pnas.0908712106>
- Sunwoo, H.H., Gujral, N., 2015. Handbook of Food Chemistry. **Handb. Food Chem.** 1–27.

<https://doi.org/10.1007/978-3-642-41609-5>

Techer, C., Baron, F., Delbrassinne, L., Belaïd, R., Brunet, N., Gillard, A., Gonnet, F., Cochet, M.F., Grosset, N., Gautier, M., Andjelkovic, M., Lechevalier, V., Jan, S., 2014a. Global overview of the risk linked to the *Bacillus cereus* group in the egg product industry: Identification of food safety and food spoilage markers. **J. Appl. Microbiol.** 116, 1344–1358. <https://doi.org/10.1111/jam.12462>

Techer, C., Baron, F., Jan, S., 2014b. Spoilage of Animal Products: Microbial Spoilage of Eggs and Egg Products, Second Edi. ed, Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00371-2>

Techer, C., Daoud, A., Madec, M.N., Gautier, M., Jan, S., Baron, F., 2015a. Microbial Quality of Industrial Liquid Egg White: Assumptions on Spoiling Issues in Egg-Based Chilled Desserts. **J. Food Sci.** 80, M389–M398. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12764>

Techer, C., Daoud, A., Madec, M.N., Gautier, M., Jan, S., Baron, F., 2015b. Microbial Quality of Industrial Liquid Egg White: Assumptions on Spoiling Issues in Egg-Based Chilled Desserts. **J. Food Sci.** 80, M389–M398. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12764>

Techer, C., Jan, S., Gonnet, F., Grosset, N., Gautier, M., Baron, F., 2019a. Bacterial diversity on stainless steel surfaces of egg processing companies and potential of selected isolates to spoil liquid whole egg products. **J. Appl. Microbiol.** 127, 1501–1510. <https://doi.org/10.1111/jam.14403>

Techer, C., Jan, S., Gonnet, F., Grosset, N., Gautier, M., Baron, F., 2019b. Bacterial diversity on stainless steel surfaces of egg processing companies and potential of selected isolates to spoil liquid whole egg products. **J. Appl. Microbiol.** 127, 1501–1510. <https://doi.org/10.1111/jam.14403>

Tetz, G., Tetz, V., 2017. Introducing the sporobiota and sporobiome. **Gut Pathog.** 9, 1–6. <https://doi.org/10.1186/s13099-017-0187-8>

Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res.** 22, 4673–4680. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>

Tovar-Rojo, F., Chander, M., Setlow, B., Setlow, P., 2002. The products of the spoVA operon are involved in dipicolinic acid uptake into developing spores of *Bacillus subtilis*. **J. Bacteriol.**

184, 584–587. <https://doi.org/10.1128/JB.184.2.584-587.2002>

Turnbull, P.C.B., Jackson, P.J., Hill, K.K., Keim, P., Kolstø, A.B., Beecher, D.J., 2008. Longstanding Taxonomic Enigmas within the “*Bacillus cereus* group” are on the Verge of being Resolved by Far-reaching Molecular Developments: forecasts on the possible outcome by an ad hoc team. **Appl. Syst. Bacillus Relat.** 23–36. <https://doi.org/10.1002/9780470696743.ch3>

Velásquez, J., Schuurman-Wolters, G., Birkner, J.P., Abee, T., Poolman, B., 2014. *Bacillus subtilis* spore protein SpoVAC functions as a mechanosensitive channel. **Mol. Microbiol.** 92, 813–823. <https://doi.org/10.1111/mmi.12591>

Ventura, M., Fitzgerald, G.F., Van Sinderen, D., 2005. Genetic and transcriptional organization of the *clpC* locus in *Bifidobacterium breve* UCC 2003. **Appl. Environ. Microbiol.** 71, 6282–6291. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.10.6282-6291.2005>

Vepachedu, V.R., Setlow, P., 2005. Localization of SpoVAD to the inner membrane of spores of *Bacillus subtilis*. **J. Bacteriol.** 187, 5677–5682. <https://doi.org/10.1128/JB.187.16.5677-5682.2005>

Viator, C.L., Cates, S.C., Karns, S.A., Muth, M.K., Noyes, G., 2016. Food safety practices in the egg products industry. **J. Food Prot.** 79, 1210–1215. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-15-520>

Vieira, D.A.P., Cabral, L., Noronha, M.F., Júnior, G.V.L., Sant’Ana, A.S., 2019. Microbiota of eggs revealed by 16S rRNA-based sequencing: From raw materials produced by different suppliers to chilled pasteurized liquid products. **Food Control** 96, 194–204. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.09.016>

Warda, A.K., den Besten, H.M.W., Sha, N., Abee, T., Nierop Groot, M.N., 2015. Influence of food matrix on outgrowth heterogeneity of heat damaged *Bacillus cereus* spores. **Int. J. Food Microbiol.** 201, 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.02.010>

Warda, A.K., Tempelaars, M.H., Abee, T., Nierop Groot, M.N., 2016a. Recovery of heat treated *Bacillus cereus* spores is affected by matrix composition and factors with putative functions in damage repair. **Front. Microbiol.** 7, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01096>

Warda, A.K., Tempelaars, M.H., Boekhorst, J., Abee, T., Groot, M.N.N., 2016b. Identification of CdnL, a putative transcriptional regulator involved in repair and outgrowth of heat-damaged *Bacillus cereus* spores. **PLoS One** 11, 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148670>

- Wells-Bennik, M.H.J., Eijlander, R.T., den Besten, H.M.W., Berendsen, E.M., Warda, A.K., Krawczyk, A.O., Nierop Groot, M.N., Xiao, Y., Zwietering, M.H., Kuipers, O.P., Abee, T., 2016. Bacterial Spores in Food: Survival, Emergence, and Outgrowth. **Annu. Rev. Food Sci. Technol.** 7, 457–482. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-041715-033144>
- Whiley, H., Ross, K., 2015. Salmonella and eggs: From production to plate. **Int. J. Environ. Res. Public Health** 12, 2543–2556. <https://doi.org/10.3390/ijerph120302543>
- Woldemeskel, S.A., Alvarez, L., Daitch, A.K., Zeinert, R., Bhargava, A., Gonzalez, D., Collier, J., Chien, P., Cava, F., Goley, E.D., 2019. The conserved transcriptional regulator CdnL is required for metabolic homeostasis and morphogenesis in *Caulobacter*. *BioRxiv* 1–25. <https://doi.org/10.1101/557637>
- Wood, S.L., Waites, W.M., 1988. Factors affecting the occurrence of *Bacillus cereus* in liquid whole egg. **Food Microbiol.** 5, 103–107. [https://doi.org/10.1016/0740-0020\(88\)90028-7](https://doi.org/10.1016/0740-0020(88)90028-7)
- Yoon, S.H., Ha, S.M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H., Chun, J., 2017. Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 67, 1613–1617. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001755>
- Zhu, J., Zhang, D., Zhou, X., Cui, Y., Jiao, S., Shi, X., 2019. Development of a pasteurization method based on radio frequency heating to ensure microbiological safety of liquid egg. **Food Control** 107035. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.107035>

Capítulo 1

“Caracterização da resistência ao calor e diversidade genética de bactérias mesófilasformadoras de esporos isoladas de ovo líquido pasteurizado”

Artigo formatado segundo normas da revista Food Microbiology

Caracterização da resistência ao calor e diversidade genética de bactérias mesófilas formadoras de esporos isoladas de ovo líquido pasteurizado

Alexandra Aysha Isabel Alva Chinha, Anderson de Souza Sant'Ana

Laboratório de Microbiologia Quantitativa de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brazil.

Resumo

Os esporos são estruturas biológicas ubíquas, capazes de resistir a condições adversas do meio externo. Em um ambiente sob condições ideais, eles se transformam em células metabolicamente ativas, as quais, por meio da síntese de enzimas (proteases e lipases), assimilam os nutrientes do alimento e provocam a sua deterioração. Ademais, certos esporulados podem produzir toxinas responsáveis por problemas gastrointestinais. Portanto, a eliminação dos esporos tem se convertido em um grande desafio para as indústrias de alimentos, mais ainda para os alimentos termossensíveis. O ovo líquido pasteurizado (um ovo produto) poderia se converter em um meio ideal para o desenvolvimento de bactérias incluindo as formadoras de esporos.

Esse estudo teve como objetivo avaliar a diversidade genética e caracterizar a resistência ao calor por parte das bactérias aeróbias mesófilas formadoras de esporos. Os 200 isolados foram recuperados da matéria-prima e produto final de ovo inteiro e gema de ovo líquido resfriado pasteurizado. O potencial de resistência ao calor foi avaliado mediante uma abordagem fenotípica e genotípica. Com respeito à abordagem fenotípica, todos os isolados foram submetidos a choques térmicos sucessivos (80°C/30 min., 90°C/10 min., 100°C/5 min. e 110°C/5 min.). No caso da abordagem genotípica, buscou-se a presença de genes relacionados à resistência ao calor (*cdnL*, *spoVAD*, *dacB*, *clpC*, *dnaK* e *yitF*[Tn1546]). A identificação dos isolados foi baseada na análise filogenética da sequência parcial do gene RNA ribossomal 16S. Para caracterizar a diversidade genética, os isolados foram testados mediante técnicas de tipagem molecular (RAPD), e as vias metabólicas envolvidas na resistência a altas temperaturas foram recuperadas em alguns isolados através do *Whole Genome Sequencing*. A comunidade estudada estava dominada, principalmente, por isolados pertencentes a gênero de *Bacillus* (86%), seguido por *Brevibacillus* (10%) e *Lysinibacillus* (4%). Nos testes fenotípicos, a maior redução dos isolados foi nas condições de 80°C/30 min. (24%) e 90°C/10 min. (33%) na matéria-prima; entretanto, a redução na matéria-prima (73 e 93%) e produto final (73 e 96%)

foi similar a 100°C/5 min. e 110°C/5 min. O gene *dnaK* apresenta correlação positiva com a maior condição térmica (110°C/5min.); ainda assim, a condição térmica que apresenta o maior número de genes correlacionados positivamente (*clpC*, *cdnL*, *yitF*[*Tn1546*] e *spoVAD*) é 100°C/5 min. Uma análise de diversidade genética foi realizada com as bactérias resistentes a diferentes choques térmicos, encontrando-se uma complexa diversidade. O genoma de 4 cepas foi sequenciado, e foram encontrados genes da esporulação relacionados à formação da estrutura, estágios da esporulação, iniciação e regulação, proteínas específicas da esporulação e germinação, fatores sigma e fatores transcricionais. Além disso, genes das células vegetativas relacionadas à indução por dano, resposta ao estresse, estresse geral e reparação do DNA. A maioria das bactérias que compõem a comunidade isolada a partir de amostras de matéria-prima e produto final de ovo líquido pasteurizado possui características relacionadas ao potencial de resistência ao calor baseado nos ensaios fenotípicos e genotípicos.

Palavras chaves: esporos, resistência ao calor, ovo líquido pasteurizado

1. INTRODUÇÃO

As propriedades nutritivas, a versatilidade de uso no ambiente culinário e as bondades tecnológicas aproveitadas pela indústria de alimentos têm feito do ovo um produto mundialmente consumido, seja em casca ou industrializado. Os produtos derivados que foram acolhidos no mercado incluem o ovo inteiro, a gema ou a clara separadamente, sejam líquidos, congelados ou desidratados. No Brasil, a indústria do ovo tem experimentado um incremento significativo de 6.1% superior na produção do 2014 para o 2015, e, em termos de exportação, o crescimento das receitas geradas foi ainda mais expressivo em 101% no período de janeiro a dezembro do 2017 para o 2018, segundo a Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA) e Agência Brasileira de Promoção de Exportações e Investimentos (Apex-Brasil).

A perda da casca e parte dos compostos naturais antimicrobianos no momento da quebrado ovo, além do risco de contaminação por micro-organismos ainda presentes na casca(Aragon-Alegro et al., 2005)(Baron F. and Jan S., 2011)(Kone et al., 2013a) levou, nos últimos anos, à criação de tecnologias emergentes e métodos que assegurem a ausência de micro- organismos patogênicos e mantenham as características sensoriais e funcionais do produto (Braja, 2012). A pasteurização é a tecnologia que melhor cumpre os objetivos antes mencionados e a estratégia mais usada no mercado; assim, por exemplo, a indústria francesa usa temperaturas entre 60 e 65°C durante 2-6 minutos para o tratamento de ovo inteiro e gemade ovo líquido e tratamentos mais suaves para clara de ovo líquido de entre 55 e 57°C durante 5-6 minutos (Baron F. and Jan S., 2011). Por outro lado, a composição nutritiva do ovo representa um ambiente ideal que favorece o desenvolvimento de micro-organismos patogênicos e não patogênicos. Micro-organismos deteriorantes e patogênicos que poderiam sobrevir na cadeia produtiva e, conseqüentemente, estar presentes no produto final geram perdas econômicas não apenas na indústria de produtos de ovos, como também em produtos em que os derivados do ovo são usados como ingredientes, podendo prejudicar a saúde do consumidor (Kone et al., 2013a)(Techer et al., 2015a).

Atualmente, a vigilância de *Salmonella* continua sendo uma das tarefas mais aprimoradas na produção de ovo líquido, pois esse micro-organismo patogênico foi reportado,inclusive, em ovos tratados por pasteurização (Hara-Kudo and Takatori, 2009)(Whiley and Ross, 2015). As condições higiênicas na produção, as práticas de manipulação, como o uso eficaz do binômio tempo e temperatura na pasteurização são uns dos constróis mais rigorosos na processamento do ovo e de seus derivados (EFSA, 2014). Ainda assim, é importante lembrarque a temperatura

e tempo médio usados na pasteurização poderiam não ser suficientes para eliminar ou reduzir outros micro-organismos. Esses tratamentos, inclusive, poderiam contribuir com a seleção dos mais resistentes ou termotolerantes, tal é o caso das bactérias formadoras de esporos e *Enterococos* (Techer et al., 2015a)(Sadiq et al., 2016b). A capacidade das bactérias esporuladas para formarem biofilme nas superfícies de aço inoxidável dificulta a eliminação eficaz mediante métodos de limpeza e desinfecção, tanto dos esporos como de sua forma vegetativa, sendo capazes de perdurar no tempo (Techer et al., 2019b). Em determinado momento a liberação das células esporuladas dos biofilmes, torna-se fonte constante de contaminação no processamento nas indústrias de alimentos.

A ubiquidade, bem como a resistência a condições adversas como as altas e baixas temperaturas e flutuações de pH do ambiente, são propriedades intrínsecas das bactérias formadoras de esporos (Wells-Bennik et al., 2016)(Jan et al., 2011)(Ranawat and Rawat, 2017), o que favorece a sua presença e sobrevivência ao longo do processamento do ovo líquido pasteurizado, inclusive, mediante armazenamento a temperaturas de refrigeração. Os esporos frente a condições ótimas de nutrientes, atividade da água (a_w) e temperatura são capazes de reverter o processo de dormência e dar lugar à germinação (Singh, 2017). Nesse estado, a ativação metabólica permite a assimilação dos compostos da matriz do alimento, mediante a produção enzimática, que, conseqüentemente, resultará na alteração das propriedades tecnológicas e sensoriais do produto (André et al., 2017).

Por último, a produção de toxinas, principalmente por agentes do grupo *Bacillus cereus* sensu lato, que, em concentrações de apenas 10^3 - 10^4 esporos/grama de alimento tem provocado intoxicação, é mais um dos motivos da importância do controle de estes micro-organismos (Wells-Bennik et al., 2016)(Ehling-Schulz et al., 2019). A ocorrência de bactérias esporuladas tem se convertido numa problemática de todas as indústrias de alimentos (Oliveira et al., 2016)(Garde et al., 2018)(Alvarenga et al., 2018a)(Pia et al., 2019) (Pereira and Sant'Ana, 2018b), e a linha de produção de ovos líquidos não é uma exceção, ainda que exista uma escassa literatura que o comprove (Vieira et al., 2019) (Techer et al., 2019b).

Nesse sentido, esse estudo teve como objetivo caracterizar a resistência ao calor por parte das bactérias aeróbias mesófilas formadoras de esporos recuperadas ao longo do processo produtivo do ovo através de uma abordagem fenotípica e genotípica, e avaliar a diversidade genética e genômica das bactérias mais resistentes

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Amostras de matérias-primas e produtos finais

As amostras de ovos (matéria-prima e produto final) foram coletadas entre junho de 2014 e julho de 2015, de diferentes granjas e uma fábrica de processamento de ovo líquido pasteurizado resfriado, localizadas no sudeste do Brasil. As matérias-primas (“ovo líquido”, n= 115) foram obtidas a partir de 5 fornecedores (A, n=30; B, n=20; C, n=20; E, n=10 e F, n=20), localizados a diferentes distâncias da planta de processamento de ovos líquidos pasteurizados (**Apêndice B**), embalados e transportados sob condições de esfriamento (Vieira et al., 2019). Na produção primária, algumas amostras da matérias-primas foram submetidas a pré-tratamentos (**Apêndice A**) antes de serem transportadas, tais como uso de peróxido de hidrogênio e pasteurização após a quebra dos ovos, conforme detalhado anteriormente (Vieira et al., 2019). Além dessas amostras, foram coletadas amostras de ovos inteiros com casca (n=15), oriundos de diferentes granjas. Os produtos finais incluíam amostras de ovo inteiro líquido pasteurizado resfriado “OLIP” (n= 90) e gema de ovo líquido pasteurizado resfriado “GLP”, (n=6) obtidas a partir de uma mistura das **matérias-primas**, conforme descrito anteriormente (Vieira et al., 2019). Todas as amostras foram mantidas na câmara de congelamento a -20°C.

2.2 Contagem de bactérias mesófilas esporuladas

A contagem de bactérias mesófilas esporuladas foi conduzida com base na metodologia preconizada por (Stevenson and Lembke, 2015). Um total de 10 gramas de cada amostra foram pesados em sacos de plástico estéreis e adicionados 90 mL de água destilada estéril, seguido da homogeneização em Smasher™ (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France). Para ativação de esporos, o conteúdo foi transferido para tubos de ensaios e submetido a choque térmico de 80°C por 10 min em banho-maria e rapidamente resfriado em banho de gelo. Posteriormente, foram usadas placas com meio TGE (Ágar triptona, glicose, extrato de carne) (Kasvi®, São Paulo, Brazil) para o plaqueamento por *pour plate*. As placas foram incubadas a 35°C por 48 horas, e as contagens foram expressas em log UFC por g. As colônias com diferentes estruturas morfológicas foram selecionadas e purificadas usando-se placas de ágar nutriente (Kasvi®, São Paulo, Brazil) e incubação a 35°C por 24-48 horas.

2.3 Cepas de bactérias formadoras de esporos

Um total de 810 isolados de bactérias esporuladas foram recuperados das amostras analisadas. Um total de 200 isolados (matéria-prima dos fornecedores A, n=(32) ; B, n=(22); C, n=(21); E, n=(12); F, n=(24) e “ovo in natura” formada por ovo inteiro cru de vários fornecedores, n=(10) e produto final: OLIP, n=(68) e GLP, n=(11) foram utilizados neste estudo, a partir de uma seleção, para constituir proporcionalmente um grupo amostral de cada condição (matéria-prima e produto processado) e procedência (5 granjas e uma planta processadora) (**Apêndice B**). Posteriormente, as colônias foram transferidas para criotubos contendo 0,7mL de caldo TSB (Difco, Detroit, USA), seguindo-se incubação a 35°C por 24-48 horas e adicionadas de 0,3 mL de glicerol (Cellco®, São Carlos, Brazil), e conservadas sob congelamento a - 20°C.

2.4 Preparo das suspensões de esporos

Para o preparo das suspensões de esporos, cada uma das 200 cepas de bactérias esporuladas mesófilas foram reativadas em 100 uL de caldo nutriente (Kasvi ®, Roseto degliAbruzzi, Italy), seguindo-se incubação a 30°C por 24 horas. Após este período, cada cepa foi inoculada individualmente em 10 mL de caldo nutriente (Kasvi ®, Roseto degliAbruzzi, Italy) contendo sulfato de manganês (5 mg/L) (CNSMan) (Sigma–Aldrich, Dorset, UK), seguindo-se incubação por 24h a 30°C. Uma alíquota de 400 uL do caldoCNSMan foi espalhada em uma placa contendo ágar nutriente com sulfato de manganês (Sigma–Aldrich, Dorset, UK), seguindo-se incubação a 30° por até 30 dias. Durante o período de incubação, as placas foram monitoradas através de coloração de esporos até que 90% do campo de observação microscópica estivesse tomado por esporos (Peña et al., 2014)(Martinez et al., 2016)(Alvarenga et al., 2018a). Em seguida, o conteúdo crescido nas placas foi lavado com água destilada estéril, seguindo-se centrifugação a 4000 × g por 20 min a 4°C. Posteriormente, o conteúdo foi ressuspendido em 50 mL de água destilada esterilizada, repetindo-se este procedimento por mais duas vezes. O ajuste da concentração de esporos se deu empregando-se água destilada estéril e usando-se contagem em microscópio com câmara de Neubauer. A concentração de esporos em cada suspensão foi ajustada para 10⁶ esporos/mL. A confirmação da concentração de esporos ocorreu através de contagem em ágar nutriente após choque térmico de 80°C por 10 min de acordo com a metodologia preconizada por (Stevenson and Lembke, 2015). Esporos suspensos em água destilada estéril foram submetidos ao choque. O choque térmico foi realizado em banho-maria modelo Q334M-28 (Quimis ®, Diadema, Brazil) e, por último,

foram imediatamente transferidos para banho de gelo até resfriar. As suspensões foram armazenadas a -20°C até seu uso.

2.5 Seleção das cepas mais resistentes a choques térmicos sucessivos

Choques térmicos sucessivos com temperaturas entre 80°C e 110°C foram aplicados com o objetivo de selecionar as cepas mais resistentes ao calor. Para isto, a suspensão de esporos foi diluída/centrifugada com água destilada estéril até atingir a concentração padrão de 10^6 esporos/mL. A partir do inóculo ajustado, uma alíquota de aproximadamente 25 uL da suspensão de esporos de cada cepa foi inoculada em tubos capilares (external 1.5 mm; internal 1.1 mm; length 75 mm) (Lamiglass, São Paulo, Brazil), seguindo-se selamento com um maçarico. Os tubos capilares selados (n=3 por cepa) e contendo a suspensão de esporos de cada cepa foram submetidos aos choques térmicos sucessivos, em banho de óleo (Cole-Parmer, Montreal, Canada), nas seguintes condições: 80°C/30 min, 90°C/10 min, 100°C/5 min e 110°C/5 min. Após exposição a cada binômio tempo/temperatura descrito, os tubos capilares foram colocados em banho de gelo e abertos em condições assépticas após higienização com etanol 70%. Então, uma alíquota de 3 uL do volume contido em cada tubo capilar foi inoculada em uma placa de ágar nutriente. Após incubação a 30°C por 24 h, observou-se a presença ou ausência de crescimento bacteriano nas placas, o que foi considerado como indicativo de que a cepa sobrevivia ou não àquele choque térmico. Somente foram submetidas ao choque térmico posterior aquelas cepas que sobreviveram a um choque térmico imediatamente inferior.

É necessário sinalizar que a comunidade esporulante da matéria-prima inclui os isolados recuperados de cinco fornecedores (A, B, C, E e F), além de um sexto grupo (N) conformado por isolados de vários fornecedores (não indicados). A comunidade de esporulados do produto final esteve conformada por isolados recuperados de produtos de ovo inteiro (OLIP) e gema de ovo líquido pasteurizado (GLP) de uma fábrica de processamento de ovo líquido pasteurizado resfriado.

2.6 Identificação das bactérias esporuladas mesófilas pela técnica de sequenciamento do gene 16S rRNA

O DNA genômico das bactérias que sobreviveram aos choques térmicos sucessivos foi extraído por calor. A extração do DNA ajustou-se seguindo os protocolos conforme (Ribeiro et al., 2016) e (Ronimus et al., 1997). Após suspensão de uma colônia em 1 mL de uma solução

de TE buffer [50 mM Tris-HCl; 100 mM NaCl; 20 mM EDTA, pH=8.0] procedeu-se à centrifugação a 4000 x g por 2 min a temperatura ambiente, e o pellet foi ressuspensão em 1 mL de água Mili-Q (Millipore). Posteriormente, a suspensão foi submetida a tratamento a 100°C por 10 min, seguindo-se resfriamento em banho de gelo por 15 min. Finalmente, foram removidas as células mortas mediante centrifugação a 4000 x g por 10 min. a temperatura ambiente. Um volume de 100 uL do sobrenadante foi transferido para outro eppendorff e foram determinadas a concentração (A_{260}) e a pureza (A_{260}/A_{280}) do DNA extraído mediante o espectrofotômetro UV-Vis (Shimadzu Biotech, Kyoto, Japan) e, por fim, foi estocado em eppendorff a -20°. O gene rRNA 16S foi amplificado parcialmente usando os primers universais 27 f: 5'-AGAGTTTGGATCMTGGCTCAG-3' e 1492 r: 5'-CGGTTACCTTGTTACGACTT-3' (Lane., 1991). O mix de reação com 25 uL foi composto por: 1x buffer [10 mM Tris, pH 8.3, 50 mM KCl] (Cellco®, São Carlos, Brazil), 1.5 mM $MgCl_2$ (Cellco®, São Carlos, Brazil), 200 uM de cada trifosfato de desoxinucleósido (dNTPs) (Sinapse Biotecnologia, São Paulo, Brazil), 0.5 uM de cada primer (Sigma®, St. Louis, USA) e 1.25 U de Taq DNA polimerase (Cellco®-São Carlos, Brazil). A amplificação foi realizada em um termociclador (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). As seguintes condições padrão conforme (Patagundi et al., 2011) foram utilizadas para a amplificação parcial do gene bacteriano 16S rRNA: ciclo térmico de desnaturação inicial por 4 min a 95°C, seguido de 38 ciclos de desnaturação (60 s a 94°C), anelamento (2 min. a 59.9°C), extensão (2 min a 72°C) e extensão final de 20 min a 72°C. Os produtos de PCR (1465 pb) foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% (Uniscience, São Paulo, Brazil) por 30 min junto com padrão de peso molecular DNA 1Kb (Cellco®, São Carlos, Brazil). Os fragmentos amplificados foram purificados usando o kit *Easy Pure*® (Sinapse Biotecnologia, São Paulo, Brazil) e sequenciados no Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho (LACTAD). Os produtos purificados foram sequenciados pelo método de Sanger usando o kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Life Technologies), e os mesmos primers usados para a amplificação do gene RNA ribossomal 16S, incluindo 27f e 1492r. O protocolo de ciclagem de sequenciamento consistiu-se em uma desnaturação inicial a 96 °C por 1 min, seguido por 30 ciclos de 96 °C por 15 s, 50 °C por 15 s e 60 °C por 4 min. Os amplicons foram submetidos a uma eletroforese capilar no sequenciador da série ABI3730 XL (Applied Biosystems) (Biosystems, 2002). As sequências resultantes dos primers (*forward* e *reverse*) foram montadas em *contigs* usando o software BioEdit Sequence Alignment Editor (Phillips and Gnanakaran, 2015). Os *contigs* serão submetidos à base de dados EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/>)

(Yoon et al., 2017) procurando as sequências de referência mais próximas com base na similaridade nucleotídica. Todas as sequências foram alinhadas usando o algoritmo do CLUSTALW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>) (Thompson et al., 1994). As relações filogenéticas foram determinadas usando o algoritmo Neighbour-Joining (Nei, 1987), e a construção da árvore foi realizada no software Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms (MEGAX) (Kumar et al., 2018). O suporte estatístico dos nós foi obtido por uma análise bootstrap de 1000 replicações (Felsenstein, 1985).

2.7 Diversidade genética das bactérias esporuladas mesófilas mais resistentes aos choques térmicos sucessivos

A diversidade genética das bactérias que sobreviveram aos choques térmicos sucessivos foi avaliada pela técnica de Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), conforme a metodologia proposta por (Ronimus et al., 1997). O DNA genômico foi extraído conforme item

4.6. As reações foram realizadas com um volume final de 25 µL contendo 1 x buffer [10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 0.001% gelatina (pH 8,8)] (Cellco®, São Carlos, Brazil), 4.0 mM MgCl₂ (Cellco®, São Carlos, Brazil), 200 µM dNTP (Sinapse® Biotecnologia, São Paulo, Brazil), 1.25 U AmpliTaq (Cellco®, São Carlos, Brazil), 2,5 µL de DNA genômico a uma concentração de 25 ng, 2.0 µM De cada primers OPR-1 (5'-TGCGGGTCCT-3'), OPR-2 (CACAGCTGCC), OPR-3 (5'-ACACAGAGGG-3'), OPR-04 (5'-CCCGTAGCAC-3'), OPR-5 (5'-GACCTAGTGG-3'), OPR-6 (5'-GTCTACGGCA-3'), OPR-7 (5'-ACTGGCCTGA-3'), OPR-8 (5'-CCCGTTGCCT-3'), OPR-9 (5'-TGAGCACGAG-3') e OPR-10 (5'-CCATTCCCCA-3') fornecido por (Sigma®, St. Louis, USA). As condições de ciclagem para a análise de RAPD foram as seguintes: etapa de desnaturação inicial a 94°C por 3 min, 35 ciclos de 94°C por 15 s, 36°C por 15 s e 72°C por 2 min, seguidos por uma extensão final a 72°C por 4 min. Os tempos de amplificação aleatória entre 94–36°C, 36–72°C e 72–94°C foram aplicados por 60, 45 e 45s, respectivamente. Para cada amostra foram incluídos um controle positivo para avaliar a reprodutibilidade, e um controle negativo sem adição de DNA. Os produtos da RAPD-PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1.5% a 3.5 V/cm por a total de 350 V h, corado com 0.5 µg/ml de brometo de etídio por 1 h.

2.8 Amplificação e sequenciamento de genes associados à resistência ao calor

O DNA genômico extraído, conforme item 4.6, foi utilizado também para amplificar parcialmente os genes: *cdnL*, *spoVAD*, *dacB*, *clpC* e *dnaK* e *yitF* (Tn1546). O gene *cdnL* codifica o regulador transcricional CdnL, o qual está envolvido na reparação e no crescimento de esporos danificados pelo calor (Warda et al., 2016a)(Warda et al., 2016b). O gene *spoVAD* é um dos membros do operon *spoVA*, responsável pelo transporte do ácido dipicolínico na etapa V da esporulação (Kort et al., 2005). Por outro lado, o gene *dacB* codifica uma carboxipeptidase, envolvida nas sínteses do córtex e na desidratação do núcleo do esporo (Popham et al., 1999). O gene *clpC* está classificado dentro da classe III das proteínas *heat shock*, cuja expressão é independente do fator σ^B . Todavia, o mecanismo de ação dessa classe de proteínas ainda não foi desvendado (Hecker et al., 1996). Esse gene já foi caracterizado em uma linhagem de *B. subtilis* por sua participação em processos de resistência ao calor (Kock and Hecker, 2004)(Krüger and Hecker, 1998). A partir da classe I das proteínas *heat shock*, foi escolhido o gene *dnaK* que está envolvido no enovelamento proteico e na proteção contra a desnaturação (Kumar et al., 2014). Existem evidências em *B. subtilis* de que a presença do elemento genético móvel (Tn 1546- like) que carrega o operon nomeado *spoVA*^{2mob} confere alto nível de resistência dos esporos ao calor (poderia incrementar-se até 10 vezes mais o tempo requerido para inativar aos esporos), o que gera a hipótese de que as proteínas codificadas pelo operon *spoVA*^{2mob} têm um papel auxiliar na captação de DPA durante a esporulação (Berendsen et al., 2016).

Os primers para a amplificação parcial dos genes *cdnL*, *spoVAD* e *clpC* foram desenhados pela primeira vez neste estudo. Os primers *dacB*, *dnaK* e *yitF* (Tn1546- like) foram usados conforme descrito por (Scheffers, 2005a) e (Selby et al., 2011), respectivamente.

2.8.1 Desenho dos primers para os genes *cdnL*, *spoVAD* e *clpC*

O desenho dos primers ajustou-se seguindo o protocolo conforme (Lowe et al., 1990)(Lorenz, 2012) (Goulart M. C., Cueva L.G., Attili D., 2019), tendo as sequências dos genes *cdnL*, *spoVAD* e *clpC* sido recuperadas da base GenBank do NCBI (The National Center for Biotechnology Information). As sequências foram analisadas com o algoritmo BLASTN (Altschul, 2006) com o objetivo de recuperar sequências de outros grupos bacterianos com similaridade aos genes-alvo. As sequências que apresentaram alinhamentos significativos (> 80% de identidade) foram incluídas no desenho dos primers. Para o alinhamento e detecção da

região consenso mais conservada utilizou-se a ferramenta online ClustalW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>) (Thompson et al., 1994). Nucleotídeos degenerados foram colocados nas posições da região conservada onde os nucleotídeos não eram idênticos. Para garantir o desempenho dos pares de primers, foram considerados os seguintes parâmetros físicos: a T_m (melting temperature) foi de, no mínimo, 45°C e, no máximo, de 65°C; O percentual de GC girou entre 40-60% de conteúdo. O comprimento dos primers foi de, no mínimo, 18 e, no máximo, de 26 pares de bases. Os pares de primers tiveram uma T_m que não variava mais do que 5°C entre si e possuíam também regiões complementares, como mostra a Tabela 1. As análises das sequências e determinação daqueles parâmetros físicos foram analisadas com a ferramenta online OligoAnalyzer (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>). A verificação da especificidade dos primers foi realizada na ferramenta online Primer BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

Tabela 1: Temperatura de melting, %GC e comprimento dos primers desenhados para os genes *cdnL*, *spoVAD* e *clpC*

Gene	Sequência (5'→3')	T_m (°C)		
		(temperatura de melting)	%GC	Comprimento (nucleotídeos)
<i>cdnL</i>	f: CGGAGCAGGTATAATTGAAG	58.8	45.0	20
	r: ACGTACAACCTTCAGCRCCTTC	60.0	47.0	21
<i>spoVAD</i>	f: CRGAATACGGDGGVCAAAARC	58.6	45.0	22
	r: GGCTTAAWARNGCNCCNGTCG	61.0	47.0	21
<i>clpC</i>	f: GGAAGATTCACAGAAAGAGC	58.0	45.0	20
	r: CGTTTHGGATCTTTCAATCC	57.3	40.0	20

2.8.2 Reações de PCR para os genes associados a resistência ao calor

Para a preparação do mix (25 uL de volume) para cada gene, foram usados os seguintes reagentes: 1x buffer [10 mM Tris, pH 8.3, 50 mM KCl] (Cellco®, São Carlos, Brazil), 1.5 mM MgCl₂ (Cellco®, São Carlos, Brazil), 200 mM de cada trifosfato de desoxinucleósido (dNTPs)

(Sinapse® Biotecnologia, São Paulo, Brazil), 0.5 mM de cada primer *cdnL*-F(5'-CGGAGCAGGTATAATTGAAG-3') e *cdnL*-R(5'-ACGTACAACCTTCAGCRCCTTC-3'), *dacB*-F(5'-GTCGGATCCCTATGCGCATTTTCAAA-3') e *dacB*-R(5'-AAGCTCGAGACCAAGCTGCTCGGC-3'), *dnaK*-F(5'-CAGTTATGGAAGGTGGGGAAC-3') e *dnaK*-R(5'-GCTTGTCTTTTGTCTACTTGACC-3'), *spoVAD*-F(5'-CRGAATACGGDGGVCAAAARCC-3') e *spoVAD*-R(5'-GGCTTAAWARNGCNCCNGTCG-3'), *clpC*-F(5'-GGAAGATTCACAGAAAGAGC-3') e *clpC*-R(5'-CGTTTHGGATCTTTCAATCC-3'), *yitF*-F(5'-TGGGCTTCAACATTGGAGAC) e *yitG*-R(5'-CGCCCTGCTTGTCTGGTATG) fornecidos por (Sigma®, St. Louis, USA) e 1.25U de Taq DNA polimerase (Cellco®, São Carlos, Brazil). Para amplificação, usou-se o termociclador (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA), e foram usadas as seguintes condições de ciclagem : desnaturação inicial de 2 min a 94°C, 35 ciclos de desnaturação (1 min a 94°C), anelamento (1 min a 51°C, 65°C, 56°C, 56°C e 55°C, 58°C para os genes *dnaK*, *dacB*, *cdnL*, *spoVAD*, *clpC* e *yitF*; respectivamente) e extensão (1 min a 72°C) e extensão final de 5 min a 72°C. Os produtos de PCR (1610, 450, 286, 539, 1650 e 580 pb aproximadamente para *dnaK*, *dacB*, *cdnL*, *spoVAD*, *clpC* e *yitF* respectivamente) foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% (Uniscience, São Paulo, Brazil) a 90 V por 1 hora junto com padrão de peso molecular DNA 1Kb e 100 pb (Cellco®, São Carlos, Brazil). O gel foi visualizado no UV Transiluminador (Loccus, São Paulo, Brazil). Já os fragmentos com tamanho equivalente ao esperado foram purificados com o kit DNA Purifier (Sinapse Biotecnology, São Paulo, Brazil) e o sequenciamento "Sanger" dos fragmentos purificados foi realizado no Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida (LACTAD), parte da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). As sequências resultantes foram processadas seguindo-se o mesmo procedimento do item 4.6.

2.9 Sequenciamento do genoma

Para a construção da biblioteca (Truseq DNA 350bp library), o DNA foi extraído conforme item 4.6. Após avaliação do controle de qualidade (QC), as amostras qualificadas foram selecionadas para a construção da biblioteca. A biblioteca de sequenciação foi preparada por fragmentação aleatória da amostra de DNA, seguida pela ligação do adaptador 5' e 3'. Alternativamente, a "marcação" combinou as reações de fragmentação e ligação em uma única

etapa, o que aumentou, significativamente, a eficiência do processo de preparação da biblioteca. Os fragmentos ligados ao adaptador foram, então, amplificados por PCR e purificados em gel. Para geração de cluster, a biblioteca foi carregada em uma célula de fluxo onde fragmentos foram capturados em um grampo de oligonucleótidos ligados à superfície, complementares aos adaptadores da biblioteca. Cada fragmento foi, então, amplificado em clusters clonais distintos através da amplificação da ponte. Quando a geração do cluster foi concluída, os modelos ficaram prontos para o sequenciamento. A tecnologia de Sequenciamento Illumina por Síntese (Novaseq 150bp PE, ~3Gb/sample) utilizou um método proprietário baseado em um terminador reversível que detectou as bases únicas à medida que foram incorporadas às cadeias de DNA. Os 4 dNTPs reversíveis e vinculados ao terminador foram persistentes durante cada ciclo de sequenciamento. O resultado foi um sequenciamento altamente preciso que eliminou erros específicos do contexto de sequência, mesmo dentro de regiões de sequência repetitiva e homopolímeros. Os dados de sequência foram convertidos em dados brutos para a análise. O sequenciador Illumina gerou imagens brutas utilizando software de controle de sequenciamento através de um software de análise primária integrado chamado RTA (Real Time Analysis). O binário BCL (chamadas de base) foi convertido no FASTQ utilizando o pacote illumina bcl2fastq ("Raw Data.pdf," n.d.).

2.9.1 Análises estatísticas

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism 7.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização fenotípica ao calor dos esporos bacterianos

Os esporos das bactérias provenientes da matéria-prima (127 isolados) e produto final (73 isolados) foram submetidos a 4 tratamentos térmicos sucessivos 80°C/30min, 90°C/10 min, 100°C/5min e 110°C/5 min. Para determinar a resistência a um tratamento, usou-se a representação numérica do sistema binário (1,0), de tal forma que o crescimento do isolado foi considerado como “sobrevivência” (1) e a ausência como “inativação” (0). A experimentação foi realizada por triplicata. Os isolados com resultados (1-1-1 e 1-1-0) passaram diretamente ao tratamento térmico seguinte, mais contundente. No caso dos resultados 0-0-0, eles não foram considerados no seguinte tratamento; já os isolados com resultados 1-0-0 o experimento foi repetido, considerando-se as regras anteriormente detalhadas. Quando o isolado apresentou o resultado (1-0-0) após repetição, esse foi selecionado para o próximo tratamento térmico.

Na **Figura 1**, pode-se observar o comportamento da população microbiana da matéria-prima e produto final frente aos quatro tratamentos térmicos sucessivos. Na matéria-prima, nos tratamentos térmico 80°C/30 min. (n= 127) e 90°C/10 min. (n= 97 isolados) a porcentagem desobreviventes foi maior que os mortos (inativos), os quais apenas representaram o 24 e 33% da população total, respectivamente. Por outro lado, nos tratamentos térmicos 100°C/5 min. (n= 85 isolados) e 110°C/5 min. (n= 34 isolados) a redução da população resistente foi em 73 e 93%, respectivamente. Finalmente, apenas 7% (9/127 isolados) sobreviveram ao último tratamento (110°C/5 minutos). Entretanto, os esporulados do **produto final**, provenientes de ovo inteiro (n=62 isolados) e gema de ovo (n=11 isolados), tiveram um comportamento similar aos isolados da matéria-prima na exposição aos tratamentos térmicos. A população sobrevivente foi maior nos tratamentos térmicos 80°C/30 min. (72/73 isolados) e 90°C/10 min. (58/73 isolados) e inativada em apenas 1 e 21%, respectivamente. Os tratamentos 100°C/5 min. (n=53/73 isolados) e 110°C/5 min. (70/73 isolados) reduziram a população em 73 e 96%, respectivamente. Apenas 4% sobreviveram (três isolados) ao tratamento mais agressivo (110°C/5 minutos). Ao comparar a população sobrevivente da matéria-prima com o produto final (**Figura 1**) pôde-se observar, que a 80°C/30 min., a população sobrevivente no produto final foi de 99%, contudo na matéria-prima atingiu um 76%. No tratamento 90°C/10min., a maior população sobrevivente também estava associada ao produto final (79%). Porém, a 100°C/5min., a população sobrevivente tanto para o produto final como para a matéria-prima foi de 27%. Finalmente, em 110°C/5min. a diferença da população de sobrevivente na matéria-prima foi 3% maior que no produto final. Todavia, estudos determinaram que a resistência ao calor de cepas de *B. cereus* foi mais evidente nas duas primeiras condições testadas (90°C/150min. e 100°C/15min) que no último

tratamento térmico (110°C/1.5min.) (Alvarenga et al., 2018b). Em adição, um ensaio realizado por Sadiq et al. (2016a) determinou que poucos esporos de cepas mesófilas isoladas do leite em pó foram capazes de sobreviver a tratamentos térmicos de 110°C/30 min. e inativadas em um 100% a 125°C/30 min. e que, embora o último tratamento em este trabalho tenha sido 110°C/5min., os poucos sobreviventes a esta condição térmica talvez poderiam ter resistido ainda a condições no intervalo de 110°C/30 min. a 125°C/30 min. Existe pouca pesquisa relacionada aos fatores que afetam a resistência ao calor de bactérias esporuladas em produtos derivados de ovos, mas foram encontrados vários estudos em outros alimentos que poderiam ajudar no entendimento dos fatores intrínsecos e extrínsecos na resistência dos esporos. Tais fatores são: variabilidade entre cepas da mesma espécie (Besten et al., 2017), natureza e composição dos alimentos onde os esporos são recuperados (Stoeckel et al., 2016), meio de crescimento (Aouadhi et al., 2016), tempo e temperatura de esporulação (Nicholson et al., 2000), meio de recuperação, condições de incubação após o tratamento térmico (Iciek et al., 2006), entre outros.

Por outro lado, condições de pré-tratamento da matéria-prima após quebra do ovo nas granjas (**Apêndice 1**) e distância percorrida em direção à fábrica de produção de ovo líquido pasteurizado (**Apêndice 2**) foram também fatores que poderiam ter influenciado na resistência ao calor dos esporos. Observou-se que os choques térmicos sucessivos conseguiram a menor inativação de esporos na população associada aos seguintes fornecedores: **N** (ovo inteiro com casca, procedente de diferentes granjas “distância variável”) a 80°C/30 min., nos fornecedores **E** (pasteurização, ~1000 Km. distante), **A** (peróxido de hidrogênio + pasteurização, ~500 km. distante) e **B** (peróxido de hidrogênio, ~1500 Km. distante) a 90°C/10 min., no fornecedor **B** para 100°C/5 min. e 110°C/5min. Diversos estudos reportaram que esporos de *B. subtilis*, submetidos a condições de tratamento subletal de calor (Movahedi and Waites, 2000), choque ácido (Lee et al., 2003), choque frio (Movahedi and Waites, 2002), tratamento com peróxido de hidrogênio (Scheldeman et al., 2006) durante o processo de esporulação, induzem a uma maior resistência ao calor dos esporos resultantes. O peróxido de hidrogênio, conhecido como tecnologia coadjuvante na indústria de ovos (<0.1%) no Brasil (Ministry of Agriculture, 1991) foi usada como pré-tratamento da matéria-prima, em alguns casos independentemente e em outros como auxiliar da pré-pasteurização (tratamento mais drástico). Em adição, a distância percorrida no transporte da matéria-prima, poderia ter beneficiado a recuperação dos esporos danificados e a proliferação daquelas bactérias esporuladas que não foram possíveis de ser

inativadas pelos pré-tratamentos (tratamento subletal), resultando na seleção/adaptação dos esporos mais resistentes. Por outro lado, o nível de contaminação da superfície da casca de ovo, segundo Baron and Jan. (2010), poderia alcançar de 3,6 – 6.3 log UFC/ovo da flora mesófila aeróbia, o que implicaria em uma fonte de contaminação cruzada para a indústria de ovo (Techer et al., 2015a) (Baron and Jan, 2010). Outrossim, a pasteurização e outros tratamentos nas indústrias alimentárias inativam a flora competitiva vegetativa, mas não eliminam os esporos altamente resistentes (Postollec et al., 2012b). Não obstante, os choques térmicos sucessivos de 80°C/30 min., 90°C/10 min., 100°C/5min. e 110°C/5 min. conseguiram a maior inativação de esporos na população associados ao fornecedor C (nenhum pré-tratamento, ~100 Km. distante) para os quatro choques térmicos.

Quando foi analisada a resistência dos 200 isolados, conforme a procedência da matéria-prima (fornecedores) e tipo de produto final (OLIP ou GLF), observou-se que a **80°C por 30 minutos**, a porcentagem da população sobrevivente associada aos fornecedores da matéria-prima encontrou-se em uma faixa dentre 71 - 86 %, fornecedores C (15/21 isolados) e N (12/14 isolados), respectivamente. Pelo contrário, a população associada ao produto final, especificamente de ovo inteiro líquido pasteurizado (OLIP) (n= 62 isolados), foi reduzida em apenas um 2%. Porém, os isolados da gema de ovo líquido pasteurizado (GLF) (n= 11 isolados) sobreviveram 100% (**Figura 2**). Os isolados associados à matéria-prima que resistiram à condição térmica anterior foram submetidos a **90°C por 10 minutos**. O 73 % dos isolados dos fornecedores E e B (11/15 e 16/22 isolados, respectivamente) foram capazes de sobreviver a essa condição. Por outro lado, o fornecedor C (n= 15 isolados) teve o grupo com menos sobreviventes (43%). No produto final, o 77 e 91% da população que sobreviveu a 90°C por 10 minutos estava associada com ovo inteiro (OLIP) (n= 61 isolados) e com gema de ovo (GLF) (n= 11 isolados), respectivamente (**Figura 2**). Com respeito ao tratamento a **100°C por 5 minutos**, a população sobrevivente nos cinco fornecedores (A, n= 23; C, n= 9; E, n= 11; F, n= 17 e N, n= 9 isolados) não foi maior a 29%, com exceção do fornecedor B (n= 16 isolados) que apresentou 45% de sobrevivência. Contudo, a população sobrevivente no produto final foi de 29% (OLIP) e 18% (GLF) (n= 48 e 10 isolados, respectivamente) (**Figura 2**). A tendência da redução da população de esporos associados ao produto final (**OLIP e GLF**) foi abrupta quando a população sobrevivente a 90°C foi exposta a 100°C/5min.

Finalmente, no último tratamento, a **110°C por 5 minutos**, observou-se que o grupo com a maior população de sobreviventes foi para o fornecedor B (9%, 2/22) e a menor porcentagem

foi relacionada ao fornecedor C (5%, 1/21). Assim, a população sobrevivente foi igual 7%, no fornecedor E e N (1/15 e 1/14 isolados, respectivamente). No produto final, apenas 5% (3/62) da população de ovo inteiro (OLIP) sobreviveu a essa condição, mas em gema de ovo (GLF) a população sobrevivente foi nula. Os que conseguiram sobreviver a esse tratamento térmico, foram considerados como os mais resistentes. Pelo menos um isolado de cada grupo conseguiu sobreviver a essa condição, com exceção da população do produto final de gema de ovo.

A pasteurização é o principal método para se garantir a segurança microbiológica dos produtos de ovo líquido. Deste modo, a temperatura aplicada na pasteurização é maior em gema de ovo líquido e menor em ovo inteiro líquido pasteurizado (antimicrobianos presentes na clara) devido à maior termossensibilidade das proteínas constitutivas. Deste modo, em produtos de OLIP e GLF são usadas condições de pasteurização que oscilam entre: 60-65°C/2-6 min. (Jan et al., 2011) (Zhu et al., 2019). Por outro lado, a composição do GLF fornece o meio favorável à proliferação de micro-organismos lipolíticos, e o pH é ligeiramente ácido (5,9- 6,2) podendo atingir pelo armazenamento a 6.8 (Montanhini and dos Santos Bersot, 2013) (Jan et al., 2011). Estudos mostram que o pH ótimo de crescimento de *B. cereus* está entre 6-7 (Ifeoma and Onyekachi, 2013), mas é possível seu desenvolvimento em uma ampla faixa que vai de 4.9 – 9.3 (Schneider et al., 2004). Em OLIP pela presença da clara há agentes antimicrobianos (Sunwoo and Gujral, 2015), resultando em um meio pobremente adaptado ao crescimento microbiano. O pH do albúmen vai de 7.6 e, conforme o transcorrer do tempo e temperatura de estocagem, pode atingir a 9.4 (Sunwoo and Gujral, 2015), porém como produto o OLIP apresenta o pH que vai de 7.2 – 7.9. Ambos os produtos são armazenados de 0- 4°C, podendo favorecer a seleção de micro-organismos psicrófilos. Com tudo isso, pode-se observar que o produto GLF apresenta melhores condições que favoreceriam a recuperação/adaptação das bactérias esporuladas sobreviventes ao processo de pasteurização e que, provavelmente, conseguiriam proliferar sob estas condições ótimas de crescimento. Mas como nos resultados anteriormente mencionados, no último choque térmico (110°/5 min.) 100% da população de esporos do GLF foram inativos; isso poderia ter acontecido já que as amostras de matéria-prima que os conformaram foram ovos inteiros com casca quebradas na mesma indústria de ovos líquidos e que não receberam nenhum pré-tratamento e foram transladados como ovos inteiros com casca. Enquanto isso, o OLIP composto por amostras da matéria-prima procedente dos outros fornecedores (A, E e F) como ovo líquido, foi submetido a pré-tratamentos (**Apêndice 1**), que poderiam ter acionado como tratamento subletal, resultando em esporos mais resistentes, como no trabalho experimental desenvolvido por (Movahedi and Waites, 2000),

que demonstraram que os esporos, após choques térmicos subleveis, resultaram na alteração da estrutura do esporo. Presume-se que tal procedimento aumentou a resistência ao calor. Todavia, esses resultados sugerem que os choques térmicos sucessivos propostos neste trabalho conseguiram a inativação dos esporos da população isolada de amostra da matéria-prima e produto final de ovo líquido pasteurizado resfriado. As condições de 80°C/30 min. e 90°C/10 min. não conseguiram inativar mais do que 50% da população de esporos da matéria-prima e produto final, com exceção do fornecedor C (57%). Além disso, a essas duas condições a população de esporos relacionadas ao produto final foi mais resistente em comparação com a matéria-prima. A 100°C/5 min. e 110°C/5 min. a porcentagem de sobreviventes foi similar em ambas as condições, com exceção do fornecedor B (45%) que resultou em uma maior população de esporos sobreviventes.

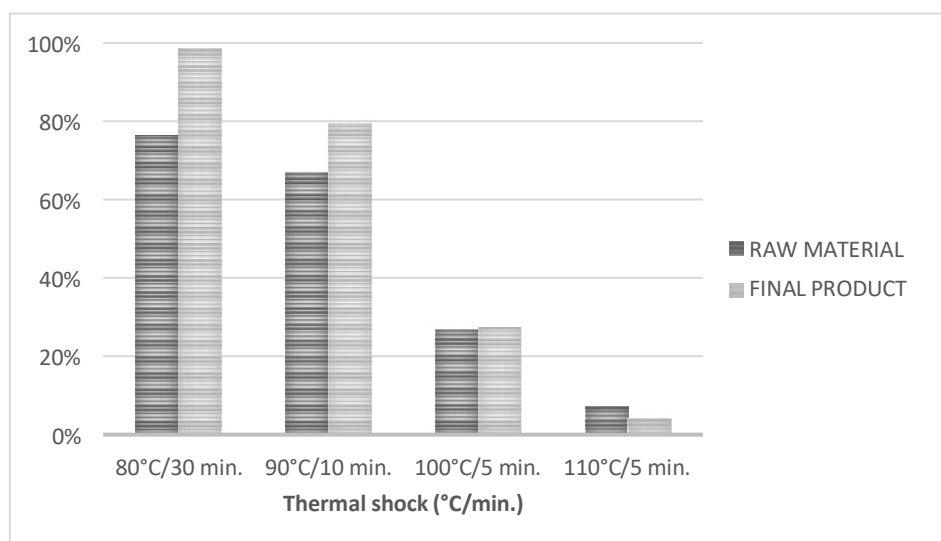


Figura 1. População sobrevivente (%) às condições de 80°C/30min, 90°C/10min., 100°C/5 min. e 110°C/5min das bactérias esporuladas isoladas de amostras de matéria-prima e produto final de ovo líquido pasteurizado resfriado

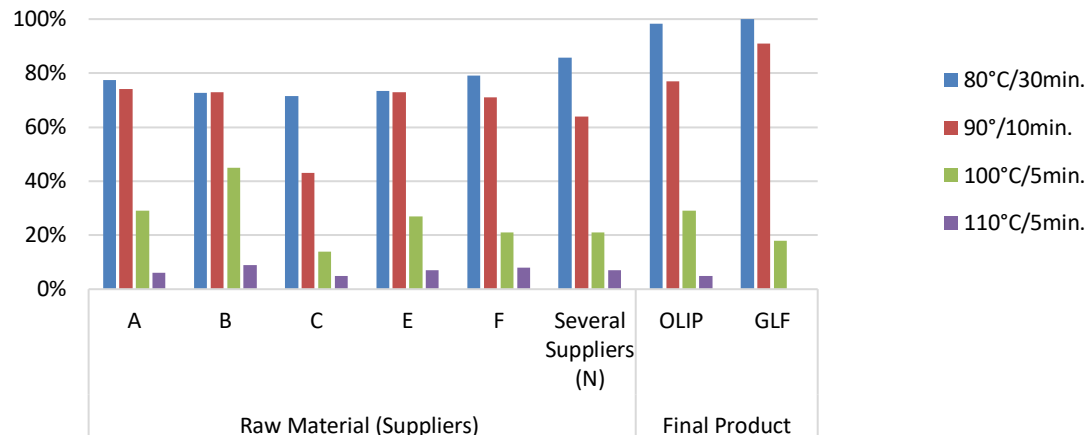


Figura 2. População sobrevivente (%) de bactérias esporuladas isoladas de amostras dos fornecedores (A, B, C, E, F e N) e produto final (OLIP e GLF) as condições de 80°C/30min, 90°C/10min., 100°C/5 min. e 110°C/5min em ovo líquido pasteurizado resfriado

3.2 Estrutura e composição da comunidade de bactérias formadoras de esporos de produtos de ovo pasteurizado

Um número representativo de isolados foram selecionados de cada grupo resistente aos choques térmicos (15 de 80°C/30min, 13 de 90°C/10 min, 10 de 100°C/5min e 12 de 110°C/5 min), totalizando 50 bactérias esporulantes. Esses micro-organismos representarão a diversidade de bactérias formadoras de esporos de produtos de ovo pasteurizado e serão, também, utilizados para caracterizar a resistência térmica.

Sequências de aproximadamente 1465 nt foram obtidas do sequenciamento do gene RNA ribossomal 16S. As sequências foram submetidas na plataforma EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/identify>), procurando os parentes mais próximos. A maioria dos alinhamentos apresentaram valores de similaridade iguais ou maiores a 99%, com referência às sequências das linhagens-tipo, com exceção dos isolados com código 12035PF (98,80%), 4050N (98,58%), 10101E (98,58%) e 12127A (96,34%) (**Tabela 2**). Análises de valores de similaridade nucleotídica com as sequências do gene RNA ribossomal 16S das espécies descritas em uma base de dados de gêneros microbianos permitiram a atribuição taxonômica (aproximação na identificação molecular da bactéria de interesse) e a recuperação de um grupo de sequências mais próximas, que permitiram, posteriormente, a reconstrução da história evolutiva, mediante a análise filogenética (Kim et al., 2012) (Yoon et al., 2017).

A identificação das bactérias mesófilas formadoras de esporos revelou que todos os isolados estavam relacionados unicamente ao filo Firmicutes, especificamente, à ordem Bacillales e agrupados em 2 famílias: Bacillaceae (*Bacillus*, *Lysinibacillus*) e Paenibacillaceae (*Brevibacillus*) (**Figura 1**). Em relação ao gênero, a comunidade estava dominada, principalmente, por isolados pertencentes a *Bacillus* (86%), seguido por *Lysinibacillus* (10%) e *Brevibacillus* (4%) (**Figura 2**). Mediante um estudo prévio a este trabalho, análises de metagenômica conduzidas por Vieira et al. (2019) determinaram dentro de toda a população de micro-organismos a classe Bacilli. Por outro lado, outros trabalhos relacionados a bactérias esporuladas em produtos de ovo líquido pasteurizado reportaram à presença de bactérias do grupo de *Bacillus cereus* (Techer et al., 2015b)(Wood and Waites, 1988)(Baron F. and Jan S., 2011)(Jan et al., 2011)(Kone et al., 2013b). No entanto, Postollec et al. (2012b) determinaram adicionalmente a presença de *B. subtilis* e *Lysinibacillus fusiformis* em produtos à base de ovo (ovo inteiro, gema, clara de ovo líquido e ovo em pó). Não foram encontrados trabalhos relacionados com a detecção do gênero *Brevibacillus* em produtos de ovo.

Ademais, este estudo revelou que *Bacillus* foi o gênero com maior diversidade de espécies (*B. cereus*, *B. wiedmanii*, *B. paramycoides*, *B. tropicus*, *B. albus*, *B. paranthracis*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. safensis*, *B. altitudinis*, *B. siamensis* e *B. flexus*). Adicionalmente, a população mais abundante pertenceu ao grupo *Bacillus cereus* (24/43 isolados). Dentre as espécies do grupo *Bacillus cereus*, destacaram-se *Bacillus paramycoides* 29% (7 isolados), seguidos por *Bacillus wiedmanii* 25% (6 isolados), *Bacillus tropicus* 17% (4 isolados), *Bacillus cereus* e *Bacillus paranthracis*, ambos com 13% (3 isolados) e *Bacillus albus* 4% (1 isolado) (**Figura 2**). Resultados similares foram reportados no estudo conduzido por Grosset et al. (2007), no qual espécies de bactérias psicrótróficas do grupo de *B. cereus* foram encontrados responsáveis pela deterioração em produtos de ovo inteiro líquido pasteurizado, mostrando a importância do controle da contaminação por este grupo de micro-organismos em produtos de ovo, usados geralmente na composição de outros produtos processados, também sensíveis a altas temperaturas (Jan et al., 2011) (Techer et al., 2014a). Representantes destes gêneros já foram reportados em estudos prévios relacionadas a comunidades bacterianas esporuladas presentes em ovo e ovo produtos (Wood and Waites, 1988)(Baron F. and Jan S., 2011)(Jan et al., 2011)(Kone et al., 2013b)(EFSA, 2014)(Techer et al., 2014a)(Techer et al., 2015a) (Vieira et al., 2019) (Techer et al., 2019a).

Tabela 2. Valores de semelhança das sequências 16S rRNA de isolados da matéria-prima e produto final de ovo líquido pasteurizado resfriado.

STRAIN CODES	CANDIDATE ^(a) IDENTIFICATION	ACCESSION ^(b) NUMBER	SIMILARITY (%)
5024PF			99,79
10130F,12129G	<i>Bacillus cereus</i>	AE016877	100
10162B,10155F,10062A			100
2044N			99,76
10034G	<i>Bacillus subtilis</i>	JHCA01000027	99,75
12042PF			100
10149E			99,92
6008E		AMXN01000021	99,76
12108B,12135A			99,79
10078B			100
10105B	<i>Bacillus wiedmanii</i>	LOBC01000053	99,65
4009F,4050A			99,7
2004C,2014B			99,79
12080F	<i>Bacillus safensis</i>	ASJD01000027	100
12097C			99,02
3049F			99,58
12075B,4047PF	<i>Bacillus paramycoides</i>	MAOI01000012	99,65
12084PF			99,78
12035PF			98,80
10119E			99,93
3003A,3054F			99,71
10118E	<i>Bacillus siamensis</i>	AJVF01000043	99,51
4053N			99,72
4055N			98,58
4093PF			99,65
5068A	<i>Bacillus tropicus</i>	MACG01000025	99,79
4034C			99,93
2030PF	<i>Bacillus altitudinis</i>	ASJC01000029	99,44
10101E	<i>Lysinibacillus boronitolerns</i>	AB199591	98,58
3062A	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	AB271743	99,57
12131C,12147G,12120N			99,41
12127A	<i>Brevibacillus agri</i>	D78454	95,34
1034F	<i>Brevibacillus formosus</i>	LDCN01000015	99,27
4077C	<i>Bacillus licheniformis</i>	AE017333	99,72
10061A	<i>Bacillus albus</i>	MAOE01000087	99,29
12139N			99,36
3078B	<i>Bacillus paranthracis</i>	MACE01000012	99,22
12089PF			99,10
12124B,12112PF	<i>Bacillus flexus</i>	BCVD01000224	99,79

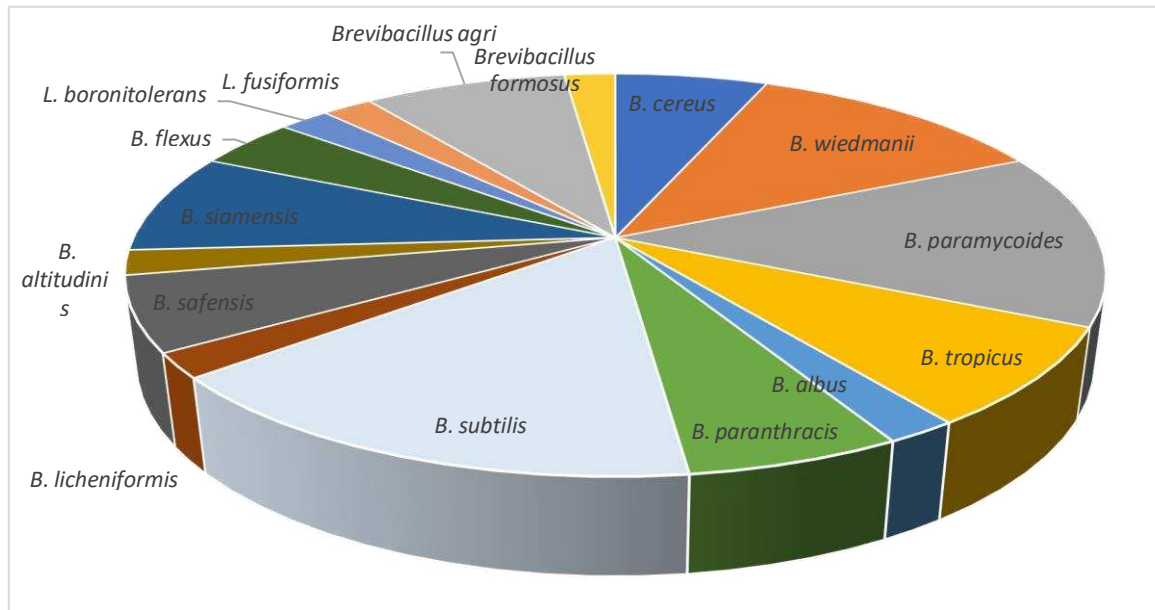


Figura 3. Distribuição das espécies de bactérias formadoras de esporos isolados da matéria-prima e produto final de ovo líquido pasteurizado resfriado baseada na similaridade das sequências do gene RNA ribossomal 16S do servidor Identify.

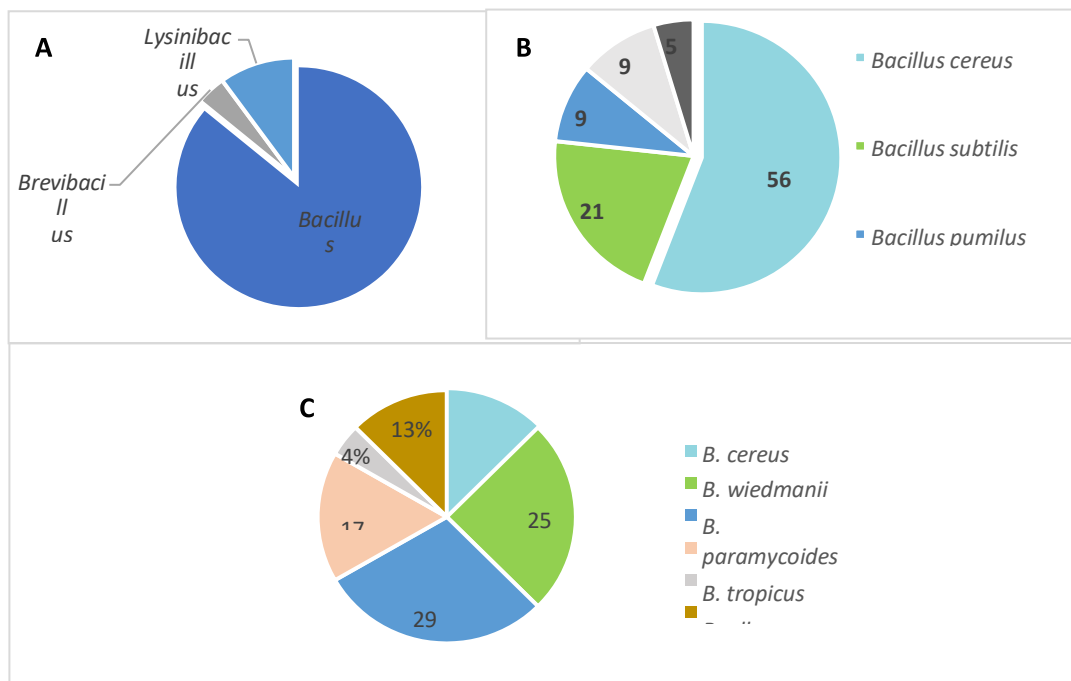


Figura 4. Distribuição das bactérias formadoras de esporos isoladas da matéria-prima e produto final de ovo líquido pasteurizado em nível de gênero (A), associadas em grupos (B) e espécies do grupo de *B. cereus* baseada na similaridade das sequências do gene RNA ribossomal 16S do servidor Identify.

3.3 Filogenia dos isolados bacterianos com base no sequenciamento parcial 16S rRNA

As sequências obtidas das 50 linhagens selecionadas, conforme o **item 5.2**, foram submetidas ao servidor Identify da plataforma EzBioCloud para a recuperação das sequências mais próximas filogeneticamente. O alinhamento global das sequências dos parentes mais próximos dos isolados foi feito com o algoritmo ClustalW, gerando 1394 posições para construção de árvore filogenética. A topologia da árvore filogenética mostrou o estabelecimento compatível de **clados** entre isolados e linhagens tipo com valores de bootstrap maiores que 60% (**Figura 5**). Consequentemente, a análise filogenética permitiu a identificação a nível de espécie. O sequenciamento parcial do gene *16S rRNA* é muito útil para a identificação de micro-organismos (Idris et al., 2020), porém existem grupos microbianos cujas sequências são altamente conservadas, sobrepondo-se as semelhanças interespecies e intraespecies. O mesmo acontece com as espécies do grupo de *Bacillus cereus* que compartilham similaridade acima de 99.5% de gêneros intimamente relacionados (Turnbull et al., 2008) (Liu et al., 2013). Contudo, existem trabalhos que, conjuntamente a esta técnica (uso do marcador *16S rRNA*), propõem melhorar a resolução da identificação entre espécies mediante uso de outros marcadores, técnicas de tipagem ou com análises bioquímicas (Liu et al., 2013) (Guinebretière et al., 2013) (Idris et al., 2020).

A partir da análise filogenética, foi possível inferir que a comunidade selecionada estava composta por 13 filotipos diferentes associados às taxas: *B. paranthracis*, *B. albus*, *B. cabrialesi*, *Brevibacillus agri*, *B. safensis*, *B. paraflexus*, *B. licheniformis*, *B. altitudinis*, *Lysinibacillus fusiformis*, *L. boronitolerans*, *B. flexus*, *B. subtilis* e *B. siamensis*. O filotipo predominante foi *B. paranthracis* (14 isolados), seguido por *B. albus* (10 isolados), membros do grupo *Bacillus cereus* e distribuídos em um mesmo clado. Juntas, ambas as espécies representaram aproximadamente a metade da comunidade de esporulados recuperados. Por outro lado, a outra metade está associada a *B. subtilis* (7 isolados), *Brevibacillus agri* (5 isolados), *B. siamensis* (4 isolados), *B. safensis* (3 isolados), *B. flexus* (1 isolado), *B. paraflexus* (isolados), *B. licheniformis* (1 isolado), *B. altitudinis* (1 isolado), *B. cabrialesi* (1 isolados), *Lysinibacillus fusiformis* (1 isolado), *L. boronitolerans* (1 isolado) distribuídos em 6 diferentes clados (**Figura 5**).

A análise filogenética, baseada nas sequências do gene RNA ribossomal 16S, mostrou-se

parcialmente concordante com a identificação baseada na similaridade das sequências da base de dados EzBioCloud. Por exemplo, os isolados (12108B, 10078B, 10105B, 4009F, 12135A, 4050A), identificados como *B. wiedmanii*, e os isolados (12097C, 3049F, 12075B, 12084F, 12035F, 10119E, 4047F), identificados como *B. paramycoides* segundo as análises de similaridade, resultaram estar associados filogeneticamente às taxas *B. albus* e *B. paranthracis*, respectivamente. Tal divergência de resultados ocorre porque a análise filogenética inclui um alinhamento múltiplo, modelos de clusterização e análises estatísticas que permitem reconstruir as associações filogenéticas dos micro-organismos em estudo. No entanto, deve-se considerar que a proximidade filogenética das espécies do gênero *Bacillus*, baseada no gene RNA ribossomal 16S, limita o poder de discriminação da análise; sobretudo nas bactérias associadas ao grupo *Bacillus cereus* (Clarridge, 2004).



Figura 5. Árvore filogenética Neighbour-Joining baseada nas sequências parciais do gene RNA ribossomal 16S dos isolados que compõem a comunidade de bactérias formadores de esporos recuperada da matéria-prima e produto final de ovo líquido pasteurizado resfriado.

3.4 Caracterização gênica da resistência ao calor

3.4.1 Amplificação de genes associados a resistência ao calor

A busca de genes marcadores para avaliar o potencial de resistência ao calor dos esporos bacterianos poderiam ser consideradas excelentes estratégias para caracterizar os mecanismos desencadeantes da resposta protetora, reparo e posterior crescimento dos esporos danificados.

A composição da estrutura do esporo, inclusive, poderia estar envolvida, além de confirmar e complementar os resultados obtidos nos ensaios de choque térmico. Os resultados encontram-se detalhados na **Tabela 3**. Nesse estudo, foram encontrados esporos de bactérias mesófilas capazes de sobreviver a condições sucessivas de até (110°C/5 min.). Mostrando deste modo o potencial fenotípico de resistência ao calor. Existem evidências em *B. subtilis* que o estágio V e VI da esporulação são importantes na resistência ao calor (Russell, 1990b). Proteínas codificadas do operon *spoVA*, são essenciais pela absorção do quelato 1:1 do DPA 2,6 e Ca^{2+} em esporos de *B. subtilis* durante a esporulação (Tovar-Rojo et al., 2002)(Li et al., 2012).

A proteína AD (SpoVAD), uma das seis proteínas codificadas pelo operon *spoVA*, está envolvida no transporte e adsorção do ácido dipicolínico na etapa V da esporulação, o que atribui ao esporo maior resistência frente ao calor úmido e estabilidade do esporo (Paidhungat et al., 2000) (Li et al., 2012). Portanto, a detecção do gene *spoVAD* seria um ótimo marcador do potencial da resistência dos esporos bacterianos (Vepachedu and Setlow, 2005). Dos 50 isolados testados foi possível amplificar o gene *spoVAD* sob as condições descritas na metodologia. Os produtos de PCR apresentaram o tamanho esperado (aproximadamente 539 pb) (**Figura 1**). Esse gene foi detectado na maioria (37/50) dos isolados testados, sendo mais frequente no grupo de isolados que resistiram apenas ao choque de 80° por 30 min. O gene *spoVAD* foi encontrado em todos os isolados pertencentes ao gênero *Bacillus*, com exceção de sete linhagens. No gênero *Brevibacillus*, o gene *spoVAD* foi detectado apenas no isolado 12120N (*Brevibacillus agri*), o qual sobreviveu ao choque de 110°C por 5 min. Porém, não foi possível detectar este gene em nenhum dos dois isolados associados ao gênero *Lysinibacillus* (3062A e 10101E). Estudos de sequências dos genomas mostraram que o gene *spoVAD* são bem conservados nas espécies de *Bacillus* e *Clostridium* (Tovar-Rojo et al., 2002). Por outro lado, para o desenvolvimento do desenho dos primers foram consideradas sequências de espécies de *Bacillus* e *Brevibacillus*, já que ainda não se contavam com os resultados da identificação e só tínhamos como referência o estudo prévio realizado por Vieira et al. (2019).

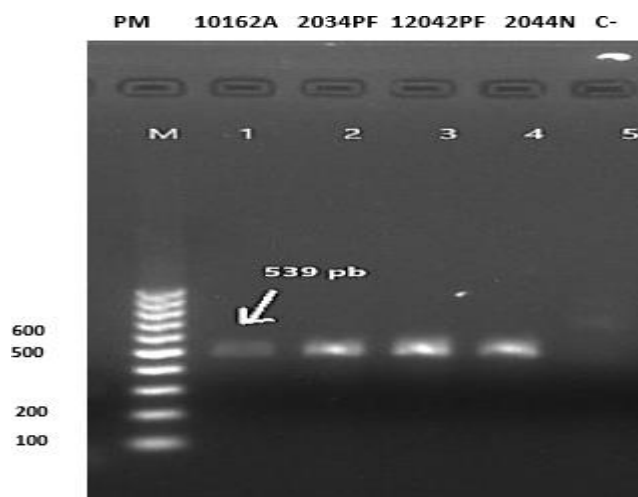


Figura 6. Amplificação do gene *spoVAD* em alguns isolados. C-: controle negativo

O gene *clpC* codifica uma protease ATP-dependente da classe III das proteínas *heat shock*, a qual está involucrada na resposta imediata após o aumento da temperatura, assim como no processo de esporulação (Kru and Hecker, 1998). Estudos em *B. subtilis* e *B. anthracis* mostraram que cepas *clpC* mutantes apresentavam um crescimento deficiente a altas temperaturas; ademais, mostraram uma redução drástica na eficiência no estágio II da esporulação, especificamente na perda do fenótipo de engolimento dos compartimentos do esporo (Krüger et al., 1994) (Singh et al., 2015). O crescimento a altas temperaturas das células vegetativas de bactérias esporuladas mesófilas poderiam dar lugar a esporos altamente resistentes ao calor. Contudo, a detecção molecular deste gene poderia determinar cepas potencialmente resistentes ao calor. Neste estudo, o gene *clpC* foi detectado, desde que se obtiveram produtos de PCR com o tamanho esperado (aproximadamente 1650 pb) (**Figura 2**). O gene *clpC* foi o segundo mais detectado dentre os genes testados, ocorrendo em vinte sete dos 43 isolados associados ao gênero *Bacillus*, seguido por duas linhagens (12127A e 12120N) associadas a *Brevibacillus*. No gênero *Lysinibacillus*, não foi detectada a sua presença. Para o desenho desses primers foram testados unicamente com espécies do gênero *Bacillus*, mas foi útil também na detecção no *Brevibacillus*, possivelmente porque a sequência nucleotídica desse gene é muito conservado entre eubactérias (Ventura et al., 2005).

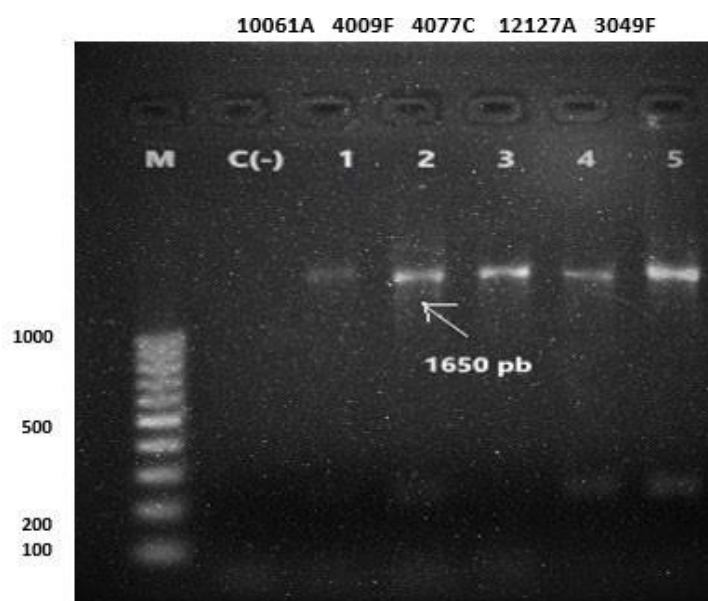


Figura 7. Amplificação do gene *clpC* em alguns isolados. C-: controle negativo

O regulador transcricional CdnL está envolvido na reparação e crescimento do esporo danificado pelo calor, permitindo sua persistência em condições de temperatura acima do ótimo crescimento (Warda et al., 2016a)(Warda et al., 2016b). Portanto, a amplificação e detecção do gene codificante do CdnL pode ser útil para determinar o potencial de resistência nos esporos e contribuir no desenvolvimento de estratégias mais eficientes para controlar o crescimento de esporos danificados. O gene *cdnL* foi amplificado e detectado sob as condições descritas na metodologia, desde que fragmentos de aproximadamente 286 pb foram detectados na eletroforese (**Figura 3**). Isolados que carregavam o gene *cdnL* pertenciam apenas ao gênero *Bacillus* e estavam associados, sobretudo, ao grupo *Bacillus cereus*. Por outro lado, o gene *cdnL* foi mais frequentemente detectado nos isolados que sobreviveram especificamente ao choque térmico de 100°C/5min. O gene “housekeeping” *cdnL* é amplamente conservado em bactérias (Woldemeskel et al., 2019). Para o desenho destes primers foram utilizados como referência unicamente espécies do gênero *Bacillus*,

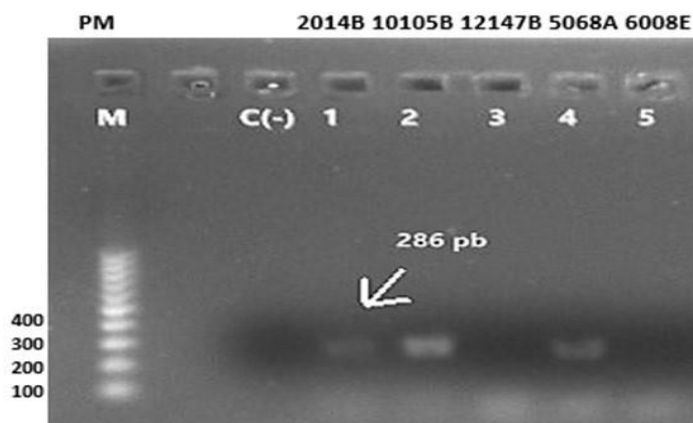


Figura 8. Amplificação do gene *cdnL* em alguns isolados. C-: controle negativo

Os primers usados para a amplificação dos genes *spoVAD*, *clpC* e *cdnL* foram desenhados conforme o item (4.8.1). O desenho dos primers incluiu sequências de várias linhagens do *Bacillus*, pois isolados deste gênero foram os mais encontrados em trabalhos envolvendo ovoprodutos. Foram obtidos resultados efetivos, confiáveis e reproduzíveis para bactérias formadoras de esporos dos gêneros: *Bacillus* e *Brevibacillus*. Entretanto, não foram detectados esses genes em membros do gênero *Lysinibacillus*. Ademais, os isolados associados a *Lysinibacillus* conseguiram resistir apenas ao choque térmico de 90°C por 10 min, o que acabou limitando o número de isolados a serem geneticamente caracterizados.

O gene *dacB* codifica uma carboxipeptidase envolvida na síntese do córtex e na desidratação do núcleo do esporo, favorecendo a resistência do esporo ao calor. Um estudo feito durante a esporulação avaliou a resistência dos esporos de cepas de *B. subtilis* ao calor através da detecção do gene *dacB* (Scheffers, 2005b). Os primers propostos por (Scheffers, 2005a) foram utilizados para detectar a presença do gene; no entanto, as condições da reação de amplificação e ciclagem foram parcialmente modificadas para fins deste estudo. Os produtos de PCR foram separados por eletroforese e se visualizaram fragmentos de aproximadamente 450 pb (**Figura 4**). O gene *dacB* foi detectado em onze dos 50 isolados selecionados; especificamente, em oito isolados do gênero *Bacillus* e em três representantes associados a *Brevibacillus*. Da mesma forma que os outros três genes, os membros do gênero *Lysinibacillus* não carregavam o gene em questão. Dos isolados positivos o gene *dacB* do gênero *Bacillus*, sete pertencem à espécie *B. subtilis*, e um foi identificado como *B.*

siamensis. Por outro lado, este gene foi cinco vezes mais frequente nos isolados que resistiram especificamente ao choquetérmico meais leve (80°C/30 min.) que naqueles que conseguiram sobreviver a 110°C por 5 min. O isolado 1034F (identificado como *Brevibacillus agri*) foi o único a resistir a esse choque.

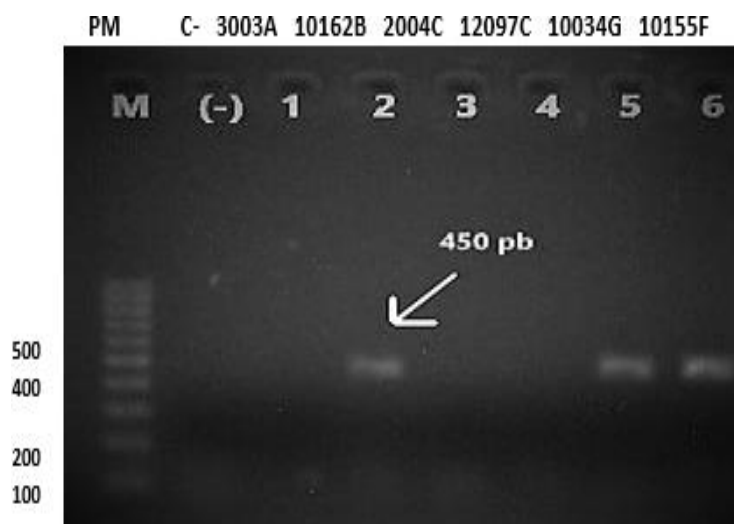


Figura 9. Amplificação do gene *dacB* em alguns isolados. C-: controle negativo

O gene *dnaK* codifica uma chaperona da classe I das proteínas *heat shock* envolvida no enovelamento proteico e na proteção de proteínas do núcleo, contra a desnaturação a altas temperaturas (Periago et al., 2002) (Selby et al., 2011). Experimentos de clonagem em *B. pumilus* e *B. licheniformis* sugerem que o gene *dnaK* confere tolerância às células hospedeiras sob alta temperatura (Liang et al., 2009) (Kumar et al., 2014). Produtos de PCR com aproximadamente 1610 pb foram detectados neste *screening* (**Figura 4**). O gene *dnaK* foi detectado em dez dos 50 isolados testados, distribuídos no gênero *Bacillus* (7/43 isolados) e *Brevibacillus* (3/5 isolados) e ausente em *Lysinibacillus*. Todavia, o grupo *Bacillus cereus* foi a espécie com mais isolados carregando o gene *dnaK* (5/8 isolados), seguido de *B. siamensis* (1/8 isolados) e *B. subtilis* (1/8 isolados). As três linhagens (12131C, 12147G e 1034F) de *Brevibacillus* positivas à detecção do *dnaK* estavam unicamente relacionadas à espécie *Brevibacillus agri*. O grupo de isolados sobreviventes ao choque térmico de 100°C por 5 min. apresentou apenas um isolado (12147G) carregando o gene *dnaK*. A sequência da proteína de choque térmico DnaK (hsp7) define uma das proteínas mais conservadas conhecidas até o momento (Gupta et al., 1997), o que poderia ser benéfico como marcador para a detecção de

cepas potencialmente resistentes ao calor.

Finalmente, o gene *yitF* (codifica uma enolasa), localizado no transposon Tn1546, foi amplificado por PCR (Besten et al., 2017). A presença desse transposon está vinculada a esporos altamente resistentes ao calor, desde que carrega o nomeado operon *spoVA*^{2mob} envolvido na intensificação da absorção de DPA no núcleo do esporo (Berendsen et al., 2016). A presença desses elementos encontrados em várias cepas de *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* e *B. licheniformis* revelaram produzir esporos com resistência significativamente maiores ao calor úmido do que suas contrapartes sem este transposon (Berendsen et al., 2016). Fragmentos de DNA, de aproximadamente 580 pb, confirmaram a presença do gene nos isolados testados. O gene foi detectado em apenas 3 isolados, especificamente em uma linhagem (10149E) associada a *Bacillus subtilis* e dois isolados (12147G e 12120N) relacionados filogeneticamente com *Brevibacillus brevis*. Esses elementos, atualmente conhecidos do transposon, já foram testados como biomarcadores genéticos para alta resistência ao calor dos esporos de espécies de *Bacillus* (den Besten et al., 2017). Porém, neste trabalho, foi usado unicamente o gene *yitF* para determinar o potencial genético de esporos altamente resistentes ao calor, além de ser o primer trabalho testado em isolados de ovo líquido pasteurizado.

3.5 Caracterização fenotípico x genotípico da resistência ao calor

Todos os isolados (15) que resistiram unicamente ao choque térmico de 80°C por 30 min. carregavam pelo menos um gene de resistência dos seis testados. O *spoVAD* foi o gene mais frequente (12 isolados) neste grupo funcional, seguido dos genes *clpC* (6 isolados), *dacB* (5 isolados), *cdnL* (4 isolados), *dnaK* (2 isolados) e o gene *yitF* (Tn1546) que esteve presente apenas em um isolado (10149E). Na maioria dos isolados (10/13) que sobreviveram especificamente ao choque de 90°C por 10min foi possível detectar pelo menos um dos seis genes testados. Como no grupo funcional anterior, o gene *spoVAD* foi o mais frequente (9 isolados), seguido dos genes *clpC* (7 isolados), *cdnL* (4 isolados), *dnaK* (4 isolados), *dacB* (2 isolados). Já o gene *yitF* (Tn1546) não foi detectado neste grupo. Diferencialmente, no isolado 12075B foram amplificados 4 genes relacionados à resistência ao calor. No entanto, os isolados 3062A, 10101E e 4053N não apresentaram nenhum dos genes testados.

Com respeito aos isolados (10) que resistiram ao choque de 100°C por 5 min., foram detectados, em todo eles, pelo menos um gene de resistência. Os genes *spoVAD* e *clpC*

foram o mais frequente entre os isolados (9 e 8, respetivamente), seguidamente dos genes *cdnL* (6 isolados) e *dacB* (3 isolados). Os genes *yitF* (Tn1546) e *dnaK*, apenas foram detectados no isolado 12147G. Finalmente, todos os isolados (13) que sobreviveram ao choque de 110°C de 5 min. apresentaram pelo menos um gene de resistência, com exceção do isolado (12112PF). Da mesma forma que todos os grupos funcionais, o gene *spoVAD* (9 isolados) foi o mais detectado, seguido de *clpC* (7 isolados), *cdnL* (4 isolados), *dnaK* (3 isolados). No caso dos genes *yitF* (Tn1546) e *dacB*, esses estavam presentes nos isolados 12120N e 1034F, respetivamente.

Deste modo, o gene *spoVAD* foi o mais detectado entre os isolados de cada grupo funcional (80°C/30min, 90°C/10 min, 100°C/5min e 110°C/5 min). Por outro lado, o gene *yitF*(Tn1546) foi o menos frequente entre os isolados; presente em três das quatro condições de estresse térmico (80°C/30min, 100°C/5 min. e 110°C/5 min.) e representados por apenas um isolado (10149E, 12147G e 12120N, respetivamente). Todos os isolados que não apresentaram nenhum dos genes de resistência ao calor estavam associados ao grupo funcionalmente resistente a 90°C por 10 min (3062A, 10101E e 4053N), com exceção do isolado (12112PF), que pertencia ao grupo resistente ao choque de 110°C por 5 min.

Os esporos dos micro-organismos avaliados foram agrupados conforme a sua resistência em quatro grupos fenotípicos. Grupo 1 (80°C/30min), 2 (90°C/10 min), 3 (100°C/5min) e 4 (110°C/5 min). De acordo com a frequência do gene nos quatro grupos funcionais, o gene *spoVAD* foi o mais frequente. Isso significa que o gene *spoVAD* representou o mecanismo mais provavelmente utilizado por esses micro-organismos para assegurar sua resistência às quatro condições.

O segundo gene mais frequente nos quatro grupos fenotípicos foi o gene *clpC*., sugerindo que, provavelmente, dentre os quatro grupos funcionais, optou-se pelo segundo mecanismo para resistir a essas temperaturas. Os grupos funcionais 2, 3 e 4 provavelmente usaram o *cdnL* como terceiro mecanismo para conseguir sobreviver a essas condições, já que foi o terceiro gene mais frequente. Entretanto, o gene *dacB* certamente representou o terceiro mecanismo mais utilizado na sobrevivência do grupo funcional 1. Já o *dnaK* representou provavelmente o quarto mecanismo para os grupos funcionais 2 e 4; enquanto os genes *cdnL* e *dacB* representaram o quarto mecanismo para os grupos funcionais 1 e 3, respetivamente. O quinto gene mais frequente nos grupos funcionais 1 e 3 foi o gene *dnaK*, e para os grupos funcionais 2 e 4 o gene *dacB*, representando os possíveis mecanismos de

resistência às respectivas condições. Finalmente, o gene que apareceu apenas uma vez nos grupos funcionais 1, 3 e 4 foi o *yitF* (Tn1546) representando o possível mecanismo de resistência para sobreviver a essas condições.

Por outro lado, o grupo funcional 2 apresentou quatro isolados nos quais não foi detectado nenhum dos genes de resistência testados neste trabalho; provavelmente foram utilizados mecanismos de resistência distintos para conseguir prevalecer a 80°C/30 min. e 90°C/10min. Além, foi inesperado determinar a ausência dos seis genes em um dos isolados do grupo funcional mais alto (110°C/5 min.), mas provavelmente conseguiu perdurar até o final dos choques térmicos mediante mecanismos alternativos não testados neste trabalho.

Tabela 3. Caracterização genética da resistência ao calor de 50 isolados agrupados segundo a resistência as condições de 80°C/30min, 90°C/10min., 100°C/5 min. e 110°C/5min

Temperature	Strain	Resistance					
Genes							
Time	code	<i>cdnL</i>	<i>spoVAD</i>	<i>clpC</i>	<i>dnaK</i>	<i>yitF[Tn1546]</i>	<i>dacB</i>
80°C per 30min.	3003 A	+	+	-	+	-	-
	12127 A	-	-	+	-	-	-
	10162 B	-	+	+	-	-	+
	12108 B	+	+	-	+	-	-
	2004 C	-	-	+	-	-	-
	12097 C	+	+	+	-	-	-
	10118 E	-	+	-	-	-	+
	10149 E	-	+	-	-	+	-
	3054 F	+	-	-	-	-	-
	3049 F	-	+	+	-	-	-
	4055 N	-	+	+	-	-	-
	2044 N	-	+	-	-	-	+
	10034G	-	+	-	-	-	+
	12042 PF	-	+	-	-	-	+
	2030 PF	-	+	+	-	-	-
	10061 A	+	+	+	-	-	-
	3062 A	-	-	-	-	-	-
90°C per 10min.	10078 B	+	+	-	-	-	-
	12075 B	+	+	+	+	-	-
	12131 C	-	+	-	+	-	+
	4077 C	-	+	+	+	-	-
	10101 E	-	-	-	-	-	-
	10155 F	-	+	-	+	-	+
	10130 F	+	+	+	-	-	-
	4053 N	-	-	-	-	-	-
	12129 G	-	+	+	-	-	-
	5024 PF	-	+	+	-	-	-
	4093 PF	-	-	+	-	-	-
	5068 A	+	+	+	-	-	-
100°C per 5min.	10062 A	-	+	+	-	-	+
	10105 B	+	+	+	-	-	-
	2014 B	+	+	+	-	-	-
	6008 E	-	+	+	-	-	+
	12139N	+	+	+	-	-	-
	4009 F	-	+	+	-	-	-
	12147 G	-	-	-	+	+	+
	12084 PF	+	+	+	-	-	-
	12035 PF	+	+	-	-	-	-
	12135 A	+	+	-	-	-	-
110°C per 5min.	4050 A	-	+	+	+	-	-
	12124 B	+	+	+	-	-	-
	3078 B	+	+	+	+	-	-
	4034 C	+	-	+	-	-	-
	10119 E	-	+	+	-	-	-
	12080 F	-	+	-	-	-	-
	1034F	-	+	-	+	-	+
	4047 PF	-	+	-	-	-	-
	12112 PF	-	-	-	-	-	-

12089PF	-	-	+	-	-	-
12120N	-	+	+	-	+	-

3.6 Correlação de genes de resistência ao calor de acordo com os choques térmicos, pré-tratamentos da matéria-prima, fornecedores/produto final e tipo de produto

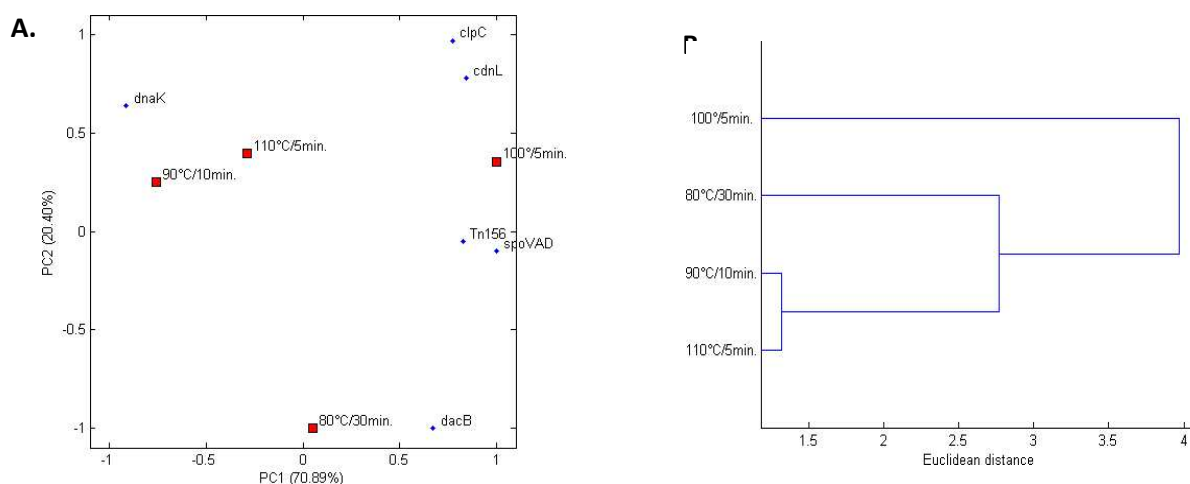


Figura 10. Análise de componentes principais (A) e dendrograma de distâncias euclidianas (B) para o agrupamento dos genes de resistência de acordo com as condições de 80°C/30min, 90°C/10min., 100°C/5 min. e 110°C/5min.

Na **figura10(A)**, pode-se observar a análise de componentes principais de quatro choques térmicos em relação à presença de seis genes de resistência ao calor. Os choques térmicos 90°C/10 min. e 110°C/5 min. encontram-se claramente agrupados e possuem uma correlação positiva com o gene *dnaK*. A agrupamento de 90°C/10 min. e 110°C/5 min. provavelmente deve-se ao fato de que os dois grupos funcionais utilizaram o mecanismo que envolve o mesmo gene, o gene *dnaK* para resistir a essas condições. No entanto, o tratamento 80°C/30 min. encontra-se distante em relação aos outros três choques térmicos e possui uma correlação positiva como gene *dacB*. No tocante às bactérias esporuladas que conseguiram resistir a 80°C/30 min. é muito provável que tenham usado um mecanismo de resistência no qual o gene *dacB* estava envolvido. Finalmente, o tratamento 100°C/5 min. possui uma correlação positiva com os genes *clpC*, *cdnL*, *Tn1546* e *spoVAD* o que significa que nessa condição os micro-organismos usaram quatro dos seis genes testados para persistir sob esta condição de estresse ao calor.

Na **figura10(B)**, podemos observar um dendrograma das amostras com as respectivas distâncias euclidianas. Nota-se, primeiramente, o agrupamento dos tratamentos 110°C/5 min. e 90°C/10 min., indicando que esses são mais similares em relação aos genes de resistência aqui avaliados. Como observado no análises de componentes principais na **figura10(A)**, essas duas

condições estavam intimamente relacionadas devido ao fato de que em ambas, seja mais provável que as bactérias formadoras de esporos tenham utilizado um mecanismo de resistência ao calor no qual o mesmo gene ou gene esteve envolvido para conseguir sobreviver. Em seguida, observa-se o agrupamento do tratamento 80°C/30 min. O tratamento 100°C/5 min. foi o elemento mais distante e o último a ser agrupado, o que significa que, para resistir a esse choque térmico, as bactérias esporuladas utilizaram um mecanismo em que os genes envolvidos provavelmente não foram os mesmos utilizados na resistência ao calor sob os outros tratamentos térmicos.

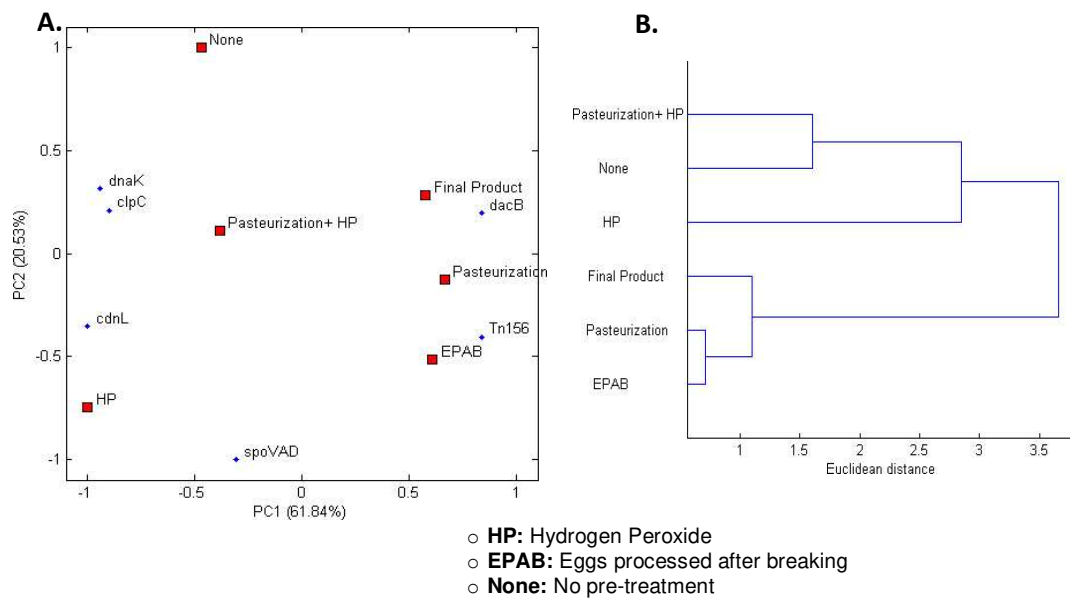


Figura 11. Análise de componentes principais (A) e dendrograma de distâncias euclidianas (B) para o agrupamento dos genes de resistência de acordo com os pré-tratamentos da matéria-prima

Na **figura11(A)**, a análise de componentes principais revelou a similaridade dos pré-tratamentos frente à presença dos genes de resistência ao calor, sendo possível observar que os pré-tratamentos de Pasteurização e EPAB são similares entre si, e possuem uma correlação positiva com o gene *yitF* (Tn1546). Portanto, o gene *yitF* (Tn1546) esteve envolvido no mecanismo de resistência sob esses dois pré-tratamentos. Por outro lado, a correlação positiva entre o gene *dacB* e o pré-tratamento aplicado no Produto final e a Pasteurização permitiu observar a similaridade entre estes pré-tratamentos. Em consequência disso, o gene *dacB* provavelmente esteve envolvido no mecanismo de resistência aos pré-tratamentos Produto final e Pasteurização. A similaridade entre o pre-tratamento Pasteurização+HP e aquele onde não foi usado algum tratamento (“None”) foi observada, além de uma correlação positiva entre estes tratamentos e os genes *dnaK* e *clpC*. Deste modo, foi possível inferir que os genes *dnaK* e *clpC*,

envolvidos no mecanismo de resistência a estas duas condições, fora provavelmente as mesmas. Finalmente, o HP apresenta certa correlação positiva com os genes *cdnL* e *spoVAD*. Portanto, a probabilidade de que os genes *cdnL* e *spoVAD* estejam vinculados no mecanismo de sobrevivência ao HP é significativa.

Na **figura 11(B)**, pode-se observar dois grandes grupos. Um formado pelos elementos: Produto Final, Pasteurização e EPAB (Ovos processados após quebra). Dentre desses elementos, Produto final foi o último a ser agrupado. Pode-se inferir que provavelmente o gene implicado no mecanismo de resistência à Pasteurização e EPAB foi o mesmo em ambos os pré-tratamentos; por outro lado, foi mais provável que outro gene de resistência ao calor esteve envolvido no mecanismo de resistência no Produto final. Esta afirmação é corroborada com os resultados obtidos no análises de componentes principais **figura 11(A)**, nos quais se podem observar os genes que mais provavelmente estiveram envolvidos na resistência a cada um dos tratamentos mencionados. No outro agrupamento estão subgrupados em Pasteurização + HP, HP e Nenhum (nenhum pré-tratamento), enquanto HP foi o último a ser agrupado. Infere-se, deste modo que, provavelmente os genes envolvidos em um ou mais de um mecanismo na resistência dos pré-tratamentos Pasteurização + HP e Nenhum (nenhum pré-tratamento) foram os mesmos, embora os genes envolvidos no mecanismo da resistência ao Peróxido de hidrogênio provavelmente tenham sido outros. Isto pode ser complementado com os resultados da análise de componentes principais **figura 11(A)**, que mostra os genes envolvidos em estes três pré-tratamentos.

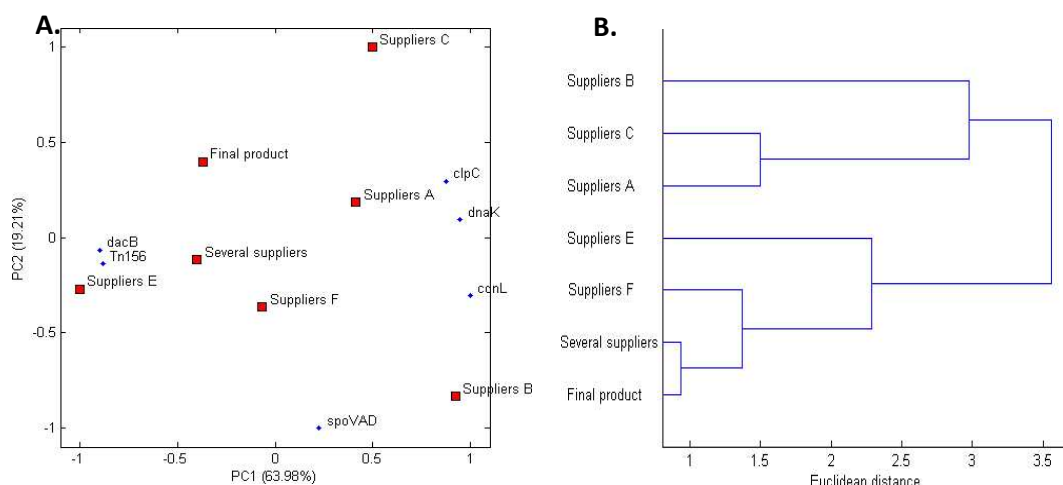


Figura 12. Análise de componentes principais (A) e dendrograma de distâncias euclidianas (B) para o agrupamento dos genes de resistência de acordo a origem das amostras: fornecedores (matéria-prima) e produto final.

Na **figura12(A)**, observa-se a análise de componentes principais mostrando a correlação entre Fornecedores e Produto final em relação à presença de seis genes de resistência ao calor. O “Produto final”, “Vários fornecedores”, “Fornecedor F” e “Fornecedor E” estão situados próximos. No entanto, o “Fornecedor E” possui uma correlação positiva mais expressiva com os genes *dacB* e *yitF* (Tn1546), do que se depreende que os micro-organismos procedentes desse fornecedor usaram mecanismos associados provavelmente aos genes *dacB* e *yitF* (Tn1546) para sua resistência ao calor. Por outro lado, através da componente principal 1 (PC1), podemos observar o agrupamento dos Fornecedores B, A e C. Através da componente principal 2 (PC2) observa-se uma correlação positiva entre o “Fornecedor B” e os genes *spoVAD* e *cdnL*, o que torna possível inferir que bactérias esporuladas procedentes deste fornecedor usaram provavelmente os genes *spoVAD* e *cdnL* no mecanismo de resistência ao calor. Já o “Fornecedor A” correlaciona-se positivamente com os genes *clpC* e *dnaK*. Deste modo, micro-organismos procedentes deste fornecedor provavelmente utilizaram os genes *clpC* e *dnaK* como parte do mecanismo de sobrevivência ao calor. Finalmente o “Fornecedor C”, encontra-se mais distante de todos os fornecedores e genes.

Na **figura12(B)**, podemos observar o dendograma com a distribuição dos fornecedores e produto final em relação à presença de genes de resistência. Observa-se a formação de dois grandes grupos. Um dos grupos formado por outros três subgrupos “Vários fornecedores” e “Produto final”, seguido do agrupamento do “Fornecedor F” e o último a ser agrupado o “Fornecedor E”. Nesse agrupamento, as bactérias procedentes de “Vários fornecedores” e “Produto final” provavelmente utilizaram os mesmos genes envolvidos em um ou mais mecanismos para sua resistência ao calor. No outro grupo, formado pelo subgrupo “Fornecedor A” e “Fornecedor C” e agrupado posteriormente mais distante do “Fornecedor B” os micro-organismos procedentes dos “Fornecedores A e C” provavelmente utilizaram os mesmos genes envolvidos no mecanismo de resistência ao calor. Por outro lado, o “Fornecedor B” utilizou genes de resistência diferentes dos utilizados pelas bactérias procedentes do “Fornecedor A y C”. Tais resultados podem ser complementados com as análises de componentes principais.

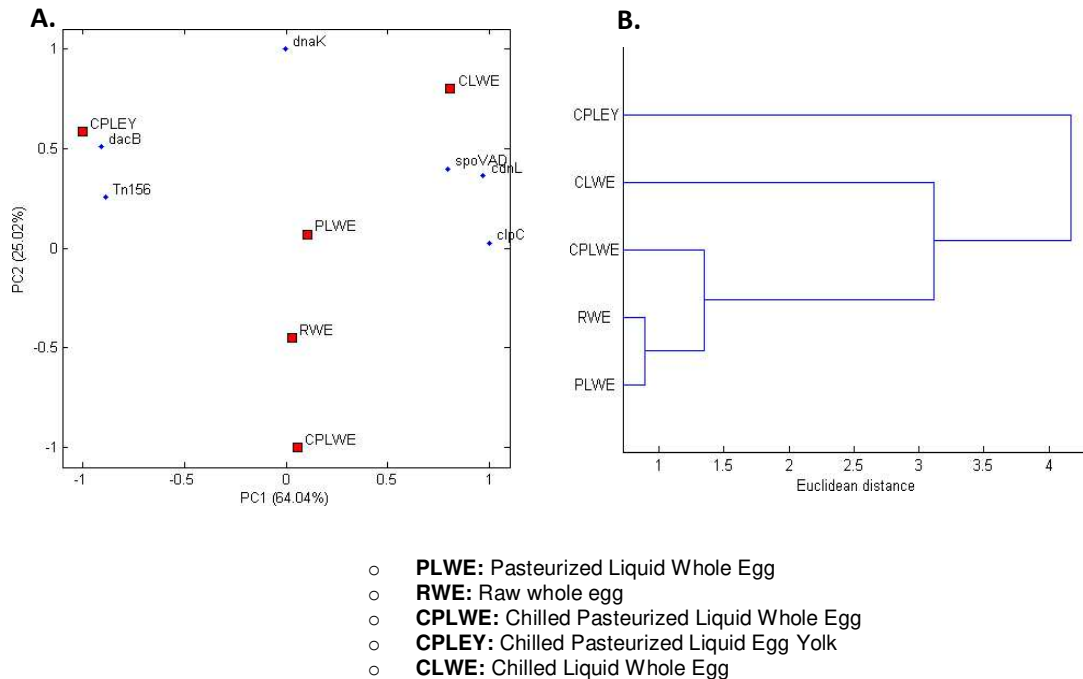


Figura 13. Análise de componentes principais (A) e dendrograma de distâncias euclidianas (B) para o agrupamento dos genes de resistência de acordo com os tipos de produtos derivados de ovos.

Na **figura 13(A)** temos a análise de componentes principais, nos quais podemos observar a similaridade entre os produtos PLWE (“Ovo inteiro líquido pasteurizado”), RWE (“Ovo inteiro cru”) e CPLWE (“Ovo inteiro líquido pasteurizado resfriado”). Através da PC1 observamos uma correlação positiva entre o produto CLWE (“Ovo líquido inteiro enfiado”) com os genes *spoVAD*, *cdnL* e *clpC*. Provavelmente, as bactérias procedentes desse produto utilizaram os genes *spoVAD*, *cdnL* e *clpC* envolvidos no mecanismo de resposta à resistência ao calor. Observa-se, também, a correlação positiva entre o elemento CPLEY (“Gema de ovo líquida pasteurizada resfriada”) em relação aos genes *dacB* e *yitF* (Tn1546). Tal correlação sugere que o mais provável é que os micro-organismos provenientes deste produto tenham usado os genes *dacB* e *yitF* (Tn1546) envolvidos no mecanismo para sua sobrevivência ao calor. Através da PC2 podemos observar uma correlação negativa entre os produtos CPLWE e RWE e todos os genes de resistência avaliados neste estudo e que os genes relacionados aos mecanismos de resistência ao calor utilizados pelas bactérias provenientes dos produtos CPLWE e RWE foram provavelmente diferentes daqueles testados.

Na **figura 13(B)** pode-se observar no dendrograma a íntima relação entre os produtos PLWE e RWE, o que elucidou que os micro-organismos isolados desses produtos possivelmente usaram os mesmos genes para o desenvolvimento do mecanismo de resistência ao calor. Dentro deste mesmo grupo, embora com maior distância, encontra-se o produto CPLWE e, em seguida,

o agrupamento do produto CLWE. Isso significa que, de fato, as bactérias isoladas desses produtos utilizaram genes envolvidos na resistência ao calor totalmente diferentes dos genes dos outros dois produtos anteriormente mencionados (PLWE e RWE). Mais distante observa-se o CPLEY (“Gema de ovo líquido pasteurizado enfriado”). No mesmo contexto, os micro-organismos procedentes desse outro produto possivelmente usaram um ou mais genes envolvidos no mecanismo de resistência, diferentes dos genes anteriormente mencionados que conformaram este mesmo grupo.

3.7 Diversidade genética das bactérias esporuladas mesófilas mais resistentes aos choques térmicos sucessivos

Com o objetivo de encontrar diferenças taxonômicas, realizou-se a amplificação aleatória de DNA polimórfico (RAPD) em 50 cepas de bactérias mesófilas formadoras de esporos, resistentes a diferentes choques térmicos (80°C/30min., 90°C/10min., 100°C/5min. e 110°C/5min.). Mediante a identificação filogenética, determinou-se que estavam conformados principalmente por cepas do gênero *Bacillus*. O fato de os membros do gênero *Bacillus* ser um grupo taxonômico tão próximo representou uma limitação no desenvolvimento da técnica. Porém, avaliou-se o potencial discriminatório de três primers (OPR-2, OPR-8 e OPR-13) para o desenvolvimento do RAPD. Na **Figura 14**, pode-se observar o perfil de bandas para 7 cepas de *B. paramycoides* obtido ao conduzir o experimento de RAPD com os primers OPR-2, OPR-8 e OPR-13, determinando-se que os primers OPR-2 e OPR-13 apresentaram um maior número de bandas (de até 9 bandas), o que significa que este primer permitiria uma melhor discriminação entre as cepas desta espécie. Por outro lado, o primer OPR-8 foi o mais efetivo para caracterizar a diversidade genética dentre todos os isolados resistentes pelo menos a um tratamento térmico.

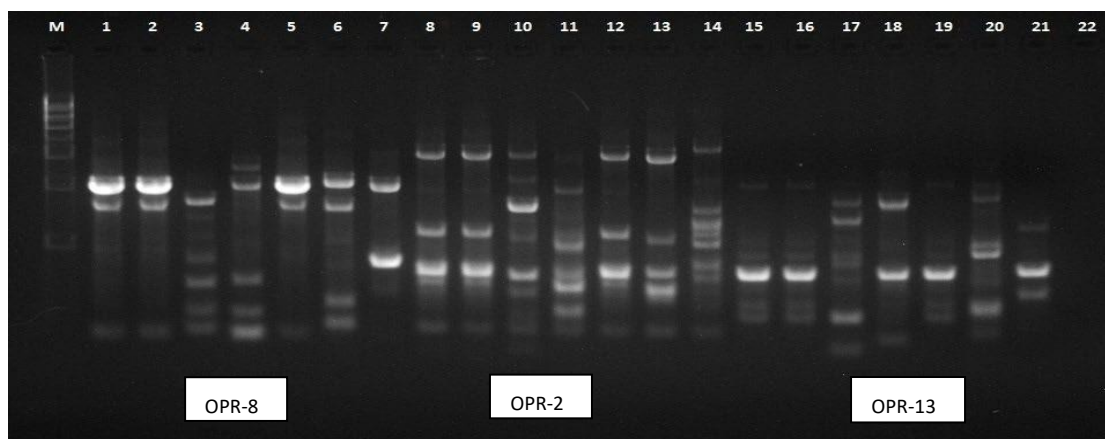


Figura 14. Perfis de RAPD a partir de DNA genômico dos isolados esporulados

recuperadas da matéria-prima e produto final e ovo líquido pasteurizado resfriado gerados por os primers OPR-8, OPR-2 e OPR-13 em 7 cepas de *B. paramycoides*. M= Marcador (1kb), 22= Controle Negativo.

Tabela 4. Distribuição das cepas nos poços de gel de agarose do perfil de RAPD gerados por os primers OPR-8, OPR-2 e OPR-13 em 7 cepas de *B. paramycoides*

Well	Strain	Primer	Species
1	12097 C	OPR 8	<i>Bacillus paramycoides</i>
2	3049 F		
3	12075 B		
4	12084 PF		
5	12035 PF		
6	1019 E		
7	4047 PF	OPR 2	<i>Bacillus paramycoides</i>
8	12097 C		
9	3049 F		
10	12075 B		
11	12084 PF		
12	12035 PF		
13	1019 E	OPR 13	<i>Bacillus paramycoides</i>
14	4047 PF		
15	12097 C		
16	3049 F		
17	12075 B		
18	12084 PF		
19	12035 PF	OPR 13	<i>Bacillus paramycoides</i>
20	1019 E		
21	4047 PF		
22	Vazio		
23	Controle negativo	OPR 13	**

Na **Figura 15, 16 e 17** podemos observar a distribuição filogenética de 50 cepas usando os perfis gerados da amplificação de RAPD dos primers OPR-2, OPR-8 e OPR-13, respectivamente. Diferenças genéticas foram encontradas entre indivíduos das mesmas espécies, quando foi feita uma análise de clusterização UPGMA. Por exemplo, indivíduos do grupo de *B. subtilis*, e representantes das espécies de *B. paramycoides* e *B. wiedmanii* se agruparam em clusters diferentes. Essa diferenciação a nível de cepas foi mais evidente usando o primer OPR-8 (**Figura. 16**). O método de tipagem de RAPD foi útil para caracterizar a diversidade genética entre cepas das mesmas espécies para o grupo de bactérias formadores de esporos mesófilos isolados de ovo líquido pasteurizado, e os primers OPR-2, OPR-8 e OPR-13 poderiam ser usados como primers potencialmente úteis para a discriminação entre cepas de

este grupo de estudado.

A análise usando o UPMA mostrou que os primers OPR-2 e OPR-13 permitiram que os micro-organismos se agrupassem em clusters e que a topologia da árvore refletisse na história evolutiva das espécies microbianas estudadas. No entanto, as análises de diversidade genética com o primer OPR-8 revelaram diferenças entre indivíduos da mesma espécie.

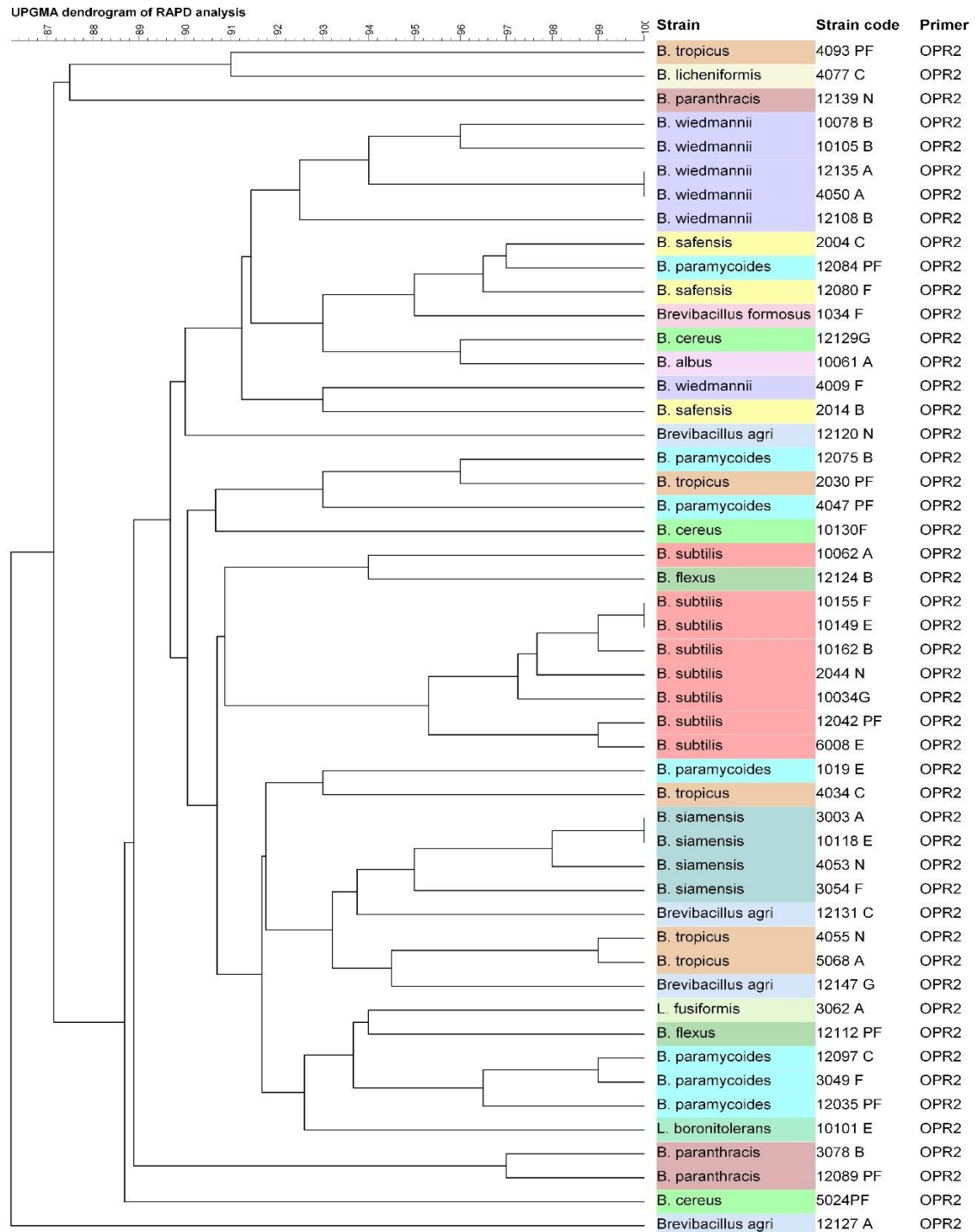


Figura 15. Dendrograma construído pelo método de grupos de pares não ponderados com média aritmética (UPGMA) mostrando dissimilaridade entre haplótipos de DNA polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD) de 50 cepas isolados de ovo líquido pasteurizado usando o primer OPR-2

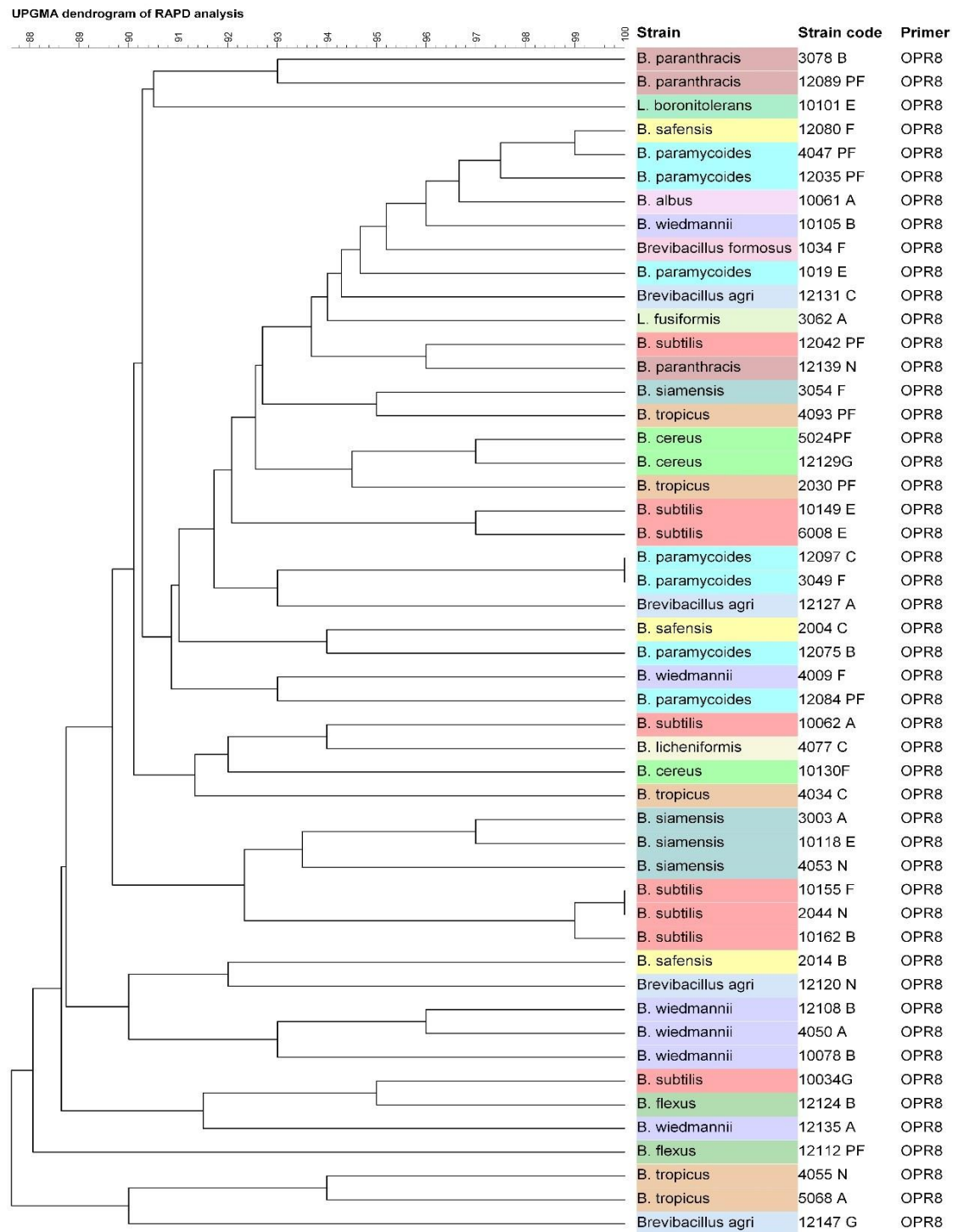


Figura 16. Dendrograma construído pelo método de grupos de pares não ponderados com média aritmética (UPGMA) mostrando dissimilaridade entre haplótipos de DNA polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD) de 50 cepas isolados de ovo líquido pasteurizado usando o primer OPR-8

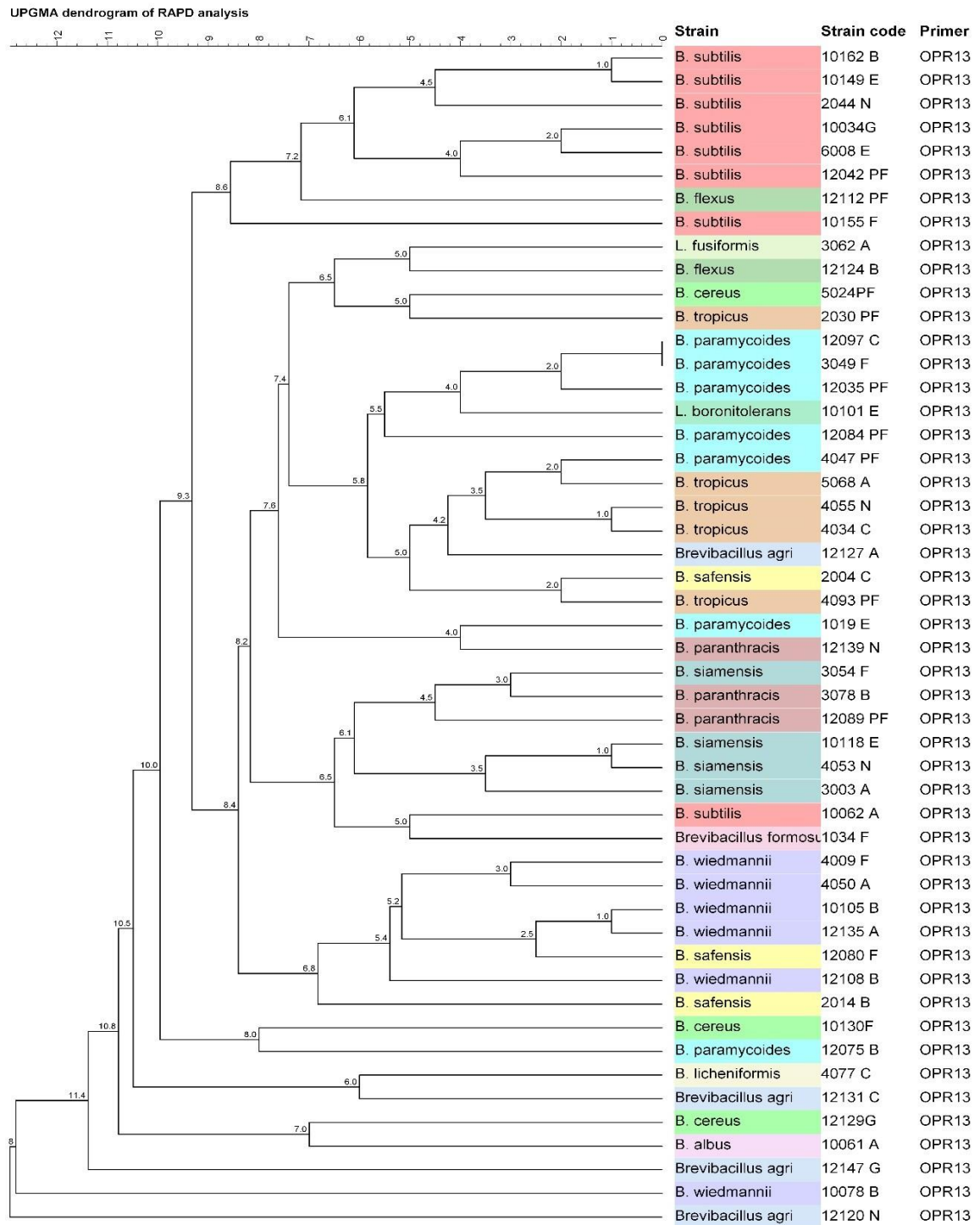


Figura 17. Dendrograma construído pelo método de grupos de pares não ponderados com média aritmética (UPGMA) mostrando dissimilaridade entre haplótipos de DNA polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD) de 50 cepas isolados de ovo líquido pasteurizado usando o primer OPR-13.

3.8 Sequenciamento do genoma de 4 cepas de esporulados sobrevivente a 80°C/30 min., 90°C/10 min., 100°C/5 min. e 110°C/5 min.

Nos últimos anos, o sequenciamento do genoma se expandiu exponencialmente como ferramenta no desenvolvimento de diversas pesquisas, o que gerou grandes avanços em várias facetas da genômica bacteriana, metagenômica, medicina clínica, arqueologia e evolução bacteriana (Dark, 2013). O sequenciamento do genoma tornou possível a caracterização *in silico* do potencial genômico que tem um micro-organismo para encarar algum tipo de estresse. Especificamente, a descrição de todas os genes que proporcionam resistência a alguma condição se denomina resistoma (Tetz and Tetz, 2017). Assim, dentro do resistoma estão incluídos os genes que, ao se expressarem, conferem resistência ao calor. A presença destes genes, isolados ou em clusters, não garante sua expressão. Portanto, uma abordagem complementar, fenotípica e genotípica pode refletir de uma melhor forma todo o potencial de uma bactéria para resistir ao calor. A aplicação da abordagem genômica foi realizada com o objetivo de reconstruir as possíveis redes genéticas que expressam os mecanismos de resistência ao calor de quatro cepas de bactérias formadoras de esporos representantes para cada grupo funcional (80°C/30 min., 90°C/10 min., 100°C/5 min. e 110°C/5 min.) isoladas de amostras de matéria-prima e produto final de ovo líquido pasteurizado resfriado. O sequenciamento dos quatro isolados foi bem sucedido desde que a partir dos “reads” gerados do sequenciamento se conseguiu montar o genoma com boa qualidade e com tamanhos próximos ao que seria esperado para o gênero *Bacillus* (Rey et al., 2004) (Sharma and Satyanarayana, 2013). Além disso, o número de proteínas identificadas também é próximo ao que se espera para o gênero (Tabela 5).

Tabela 5. Características gerais do genoma de 4 cepas representantes da resistência a 80°C/30min., 90°C/10min., 100°C/5min. e 110°C/5min.

	STRAINS			
	12097C	12129G	2014B	12135A
# READS	15.283.526	14.297.620	15.919.343	16.220.165
% GC	40.1	39.6	41.4	41.8
N50	254.688	602.203	602.203	601.883
SIZE (Mbp)	5.509.479	5.901.185	5.817.750	5.353.828
# SCAFFOLDS	56	62	29	24
# PROTEINS	5.597	6.003	5.954	5.376

A árvore filogenômica (Figura 18) distribuiu as cepas (12097C, 12129G, 2014B e 12135A)

em apenas dois cluster, sugerindo que pode não ter refletido as verdadeiras relações filogenéticas. No entanto, pode-se observar também a alta similaridade ao nível genômico entre as bactérias, desde que as cepas 12129G, 2014B e 12135A se agruparam em um grupo monofilético.

Por outro lado, observou-se que a cepa 12097 C, tanto na árvore filogenômica como filogenética (**Figura 5**) encontrou-se muito próxima ao *B. paranthracis*, porém não foi possível detectar diferenças entre as outras três cepas. Na análise genômica as pequenas diferenças são subestimadas e, por consequência, as taxas estudadas não se agruparam com as espécies mais próximas evolutivamente. Pelo contrário, a árvore filogenética valoriza essas diferenças e permite um melhor agrupamento, mesmo que o sequenciamento do gene ribossomal 16S tenha resultado pouco resolutivo para este grupo bacteriano a nível de espécie.

No entanto, ambas as análises não foram direcionadas com o objetivo de identificação das cepas, mas sim para determinar sua proximidade genômica e ter uma visão das diferenças ou semelhanças genéticas entre as cepas e seu potencial de resistência ao calor.

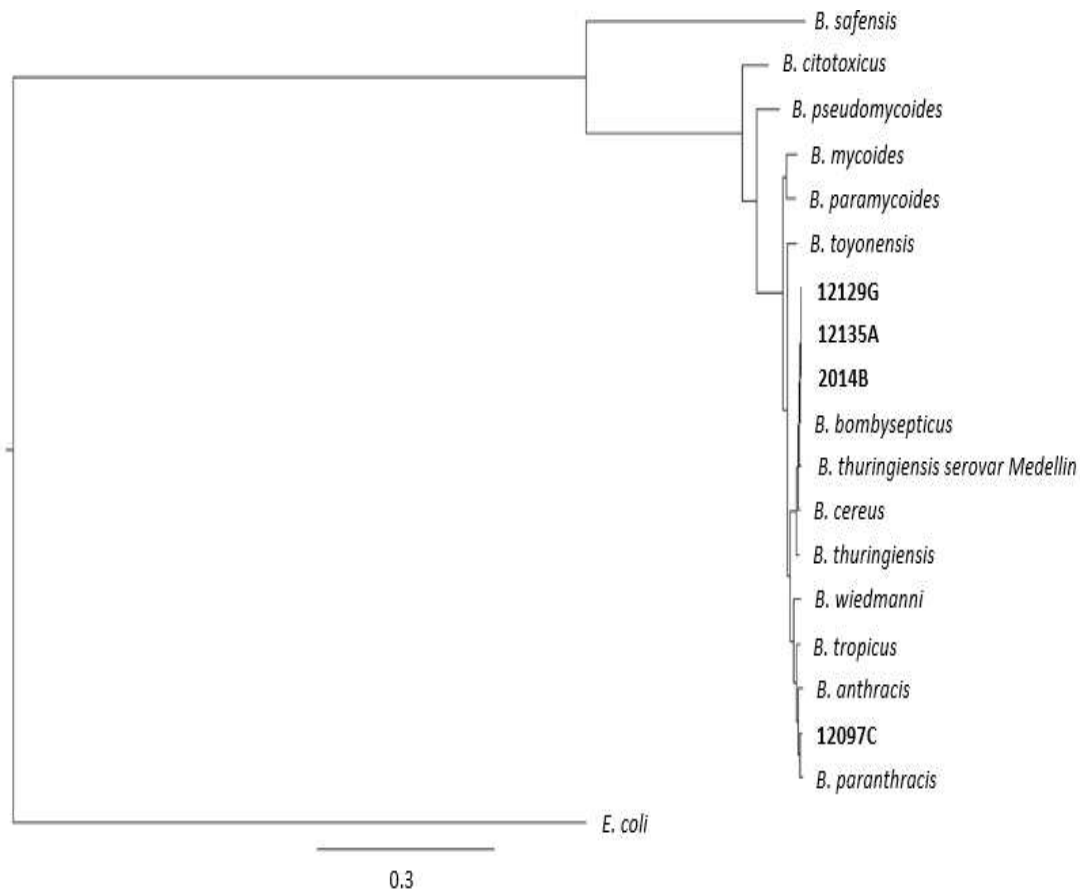


Figura 18. Á Árvore filogenômica de máxima verossimilhança 14 espécies de *Bacillus* e das 4 cepas resistentes a 80°C/30min., 90°C/10min., 100°C/5min. e 110°C/5min (12097C, 12129G,

2014B e 12135A; respetivamente). A árvore foi reconstruída com 509 ortólogos de cópia única e com 1000 randomizações *bootstrap* com suporte de 100 em cada ramo (valores não mostrados na figura). A escala da filogenia está em substituições por sítios.

O sequenciamento do genoma completo destas quatro cepas associadas filogenomicamente às taxas do grupo *Bacillus cereus* ajudou a melhorar nossa compreensão da resistência ao calor desse grupo bacteriano esporulado, comumente associados à contaminação de alimentos processados e, conseqüentemente, a melhorar a qualidade da indústria do ovo líquido pasteurizado resfriado. Apesar da proximidade evolutiva desse grupo bacteriano, as quatro cepas apresentaram algumas diferenças/semelhanças determinadas mediante uma análise de sequências de proteínas ortólogas. Assim, pôde-se observar (**Figura 19**) que existem genes que codificam proteínas ou famílias de proteínas ortólogas que são exclusivas ou compartilhadas entre elas. Deste modo, as análises de ortólogos determinou que a maior parte das proteínas (4336 famílias) foram compartilhadas entre as 4 cepas. A cepa 12135A não apresentou nenhum grupo exclusivo; devido, provavelmente, ao fato de que o número de genes analisados foi em um menor número que nas demais cepas (**Figura 5**). No caso da cepa 2014B não foram observados também genes exclusivos, embora tenha apresentado vários genes compartilhados em um maior número com a cepa 12129G e seguida da cepa 12097C. Apenas as cepas 12097C (64) e 12129G (4) apresentaram genes exclusivos. Considerando que na filogenia a cepa 12097C foi a mais distante das outras 2014B cepas, essa cepa apresentou o maior número de genes específicos. Porém, a cepa 12097C representou as bactérias esporuladas mesófilas que sobreviveram ao menor choque térmico (80°C/30 min.). As cepas 12097C e 12129G compartilharam exclusivamente dois genes, os que expressam a Nicotinamide mononucleotide transporter (PnuC) e Formamidase (AmiF). Todavia, não há reportes de que essas proteínas estejam envolvidas em mecanismos de resistência ao calor. A cepa 12097C e 2014B compartilharam unicamente a família de proteínas: Transposase, necessária para uma transposição eficiente do DNA. Entretanto, não há evidências de que sua presença seja o único fator favorável em relação à resistência térmica.

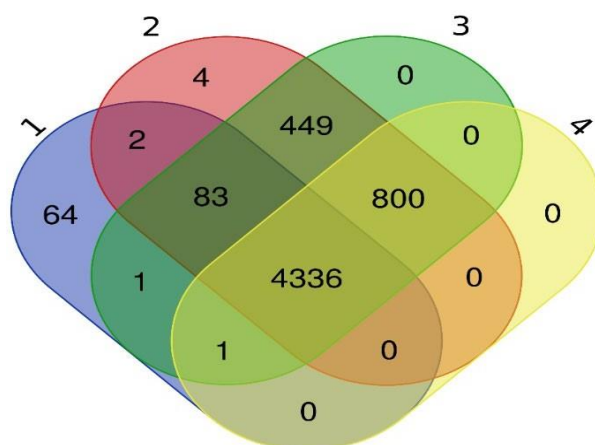


Figura 19. Diagrama de Venn das famílias de proteínas ortólogas entre as 4 cepas estudadas. 1: 12097C, 2: 12129G, 3: 2014B e 4: 12135A.

Existem proteínas estruturais da esporulação que têm sido relacionadas direta ou indiretamente com a resistência ao calor úmido. Assim, mediante a informação obtida a partir do sequenciamento do genoma, foi possível mostrar alguns genes envolvidos na codificação de proteínas estruturais e funcionais da esporulação. No **Apêndice C**, pôde-se observar proteínas relacionadas ao exósporo, glicoproteínas de superfície, proteínas envolvidas com a camada de peptidoglicano (cortex), capa cortical interna e externa do esporo, carboxipeptidase, proteína de ligação à penicilina, proteínas próprias da esporulação e proteínas implicadas na germinação. Existem estudos que afirmam que as modificações no córtex no momento da esporulação parecem ser cruciais para atingir propriedades de resistência (Garde et al., 2018), referindo-se especificamente a sínteses do peptidoglicano, que, segundo se acredita, mantêm em estado desidratado o núcleo do esporo (Sunde et al., 2009) (Bukowska-Faniband and Hederstedt, 2017) que, por sua vez, é essencial para a resistência ao calor.

Por outro lado, existem evidências indicando que alguns grupos de proteínas carboxipeptidases (PBPs) favorecem a resistência ao calor. Deste modo, dois das PBPs estão especificamente envolvidos na síntese da cortex: DacB e DacF (Driks and Setlow, 2014). Além disso, demonstrou-se que o peptidoglicano de mutantes dos genes *dacB* e *dacF* resultou em esporos deficientes para atingir a desidratação normal do núcleo de esporos e, conseqüentemente, a diminuição na resistência ao calor (Popham et al., 1999). Em um contexto similar foi descrito um grupo de PBPs (transpeptidases) devido a sua implicação na síntese do córtex (Bukowska-Faniband, 2015). Adicionalmente, outro estudo desenvolvido por Asai et al. (2001) demonstrou, em *Bacillus subtilis*, que o gene *yabQ* é essencial para formação do córtex do

esporo. Um estudo de mutações de genes que codificavam proteínas da esporulação em *B. subtilis* (*yhbH*, *ypjB*, *yqfC*, *yqfD* e *yunB*) exibiu defeitos na formação do esporo (Eichenberger et al., 2003). Em outro estudo foi determinado que a proteína YjcZ (proteína da esporulação), envolvida na montagem da capa do esporo, interfere na resistência ao calor (Kuwana et al., 2003).

Finalmente, vários estudos determinaram que alterações nos receptores da germinação do esporo poderiam resultar de forma indireta em esporos altamente resistentes ao calor. Fatores de transcrição, como o YlyA, regulam a expressão de receptores que reconhecem germinantes. Deste modo, demonstrou-se que mutantes YlyA apresentaram esporos que exibiram defeitos específicos na germinação, devido a uma desregulação ao nível de receptores (Ramirez-Peralta et al., 2012b)(Ramirez-Peralta et al., 2012a). Esporos preparados em meios ótimos geram esporos com uma quantidade diminuída de receptores, incapazes de germinar na presença de germinantes do meio externo, aumentando a probabilidade de sobreviverem a altas temperaturas do processamento na indústria de alimentos.

Ainda assim, as proteínas envolvidas nos estágios da esporulação identificadas mediante a análise do genoma foram apresentadas no **Apêndice D**. Alguns desses genes mostraram evidências de estarem envolvidas em mecanismos de resistência ao calor. Os estágios IV e V da esporulação estão envolvidos na síntese do córtex e na disposição das capas corticais, respectivamente e, durante essas duas fases se produz a desidratação do esporo. No estágio V da esporulação a água é removida do esporo, tornando-se o esporo cada vez mais resistente ao calor conforme amadurece (Piggot, 2004) (Piggot and Hilbert, 2004). Como já foi descrito o córtex do esporo está intimamente relacionado com a resistência ao calor; consequentemente, proteínas envolvidas no mecanismo de síntese e montagem poderiam estar também envolvidas na resistência a altas temperaturas. Assim, um estudo demonstrou que a síntese do córtex da esporulação depende especificamente da atividade transpeptidase da proteínas AD, do estágio V da esporulação (SpoVAD) (Bukowska-Faniband and Hederstedt, 2013). Além disso, os produtos gênicos SpoVB, SpoVD, e SpoVE foram também descritos por sua intervenção na síntese do córtex (Bukowska-Faniband and Hederstedt, 2017).

Por outro lado, podemos observar no **Apêndice E** genes que codificam proteínas funcionais identificadas neste estudo, envolvidas na esporulação. Um estudo demonstrou que a ausência da proteína YloB (ATPase de transporte de Ca^{2+}) em esporos de *B. subtilis* resultaram em esporos com uma diminuição na resistência ao calor (Raeymaekers et al., 2002). Essa

sensibilidade ao calor deve-se ao fato de que, concomitante à captação de Ca^{2+} , a célula começa a sintetizar ácido dipicolínico (DPA) e este complexo de cálcio e DPA influencia na resistência dos esporos a condições adversas, como o calor (Setlow, 1994). Continuando com a descrição das proteínas funcionais, foi realizado um estudo que indicava que uma proteína homóloga à lipoprotein YhcN/YlaJ foi encontrada presente em um transposón, demonstrando que contribuía com níveis mais altos no tocante à resistência ao calor de esporos em *B. subtilis* (Berendsen et al., 2016b).

Mesmo assim, um estudo relacionado às proteínas SASPs do tipo α/β comprovou sua intervenção na resistência ao calor úmido. Tais proteínas protegem o DNA contra danos por calor úmido mediante a saturação do DNA do núcleo do esporo em espécies de *Bacillus* e *Clostridium* (Raju et al., 2006) (Leyva-Illades et al., 2007). Os genes *spmA* e *spmB* formam parte do operon DacB e codificam proteínas envolvidas na maturação do esporo e na desidratação do núcleo dos esporos em *B. subtilis*. Estudos de mutação corroboraram que os níveis de resistência ao calor foi até oito vezes mais baixo do que os da cepa parental (POPHAM et al., 1995). Prosseguindo com as evidências corroboradas por estudos anteriores sobre as proteínas envolvidas em mecanismos de resistência ao calor encontradas neste trabalho, cabe mencionar o ácido dipicolínico sintetase, subunidades A e B (locus *spoVFA* e *spoVFB*, respetivamente) relacionadas ao estágio V da esporulação. Estudos em *B. subtilis* mostraram que esporos com mutações no locus *spoVFA* e *spoVFB* aumentaram significativamente a água do núcleo do esporo, diminuindo sua resistência ao calor (Paidhungat et al., 2000). Por outro lado, em *B. subtilis* os fatores sigma específicos da esporulação são: σ_F , σ_E , σ_G e σ_K . Esses ativam programas de transcrição que conduzem a esporulação através de seus estágios morfológicos. O sigma-K é o último fator sigma no ciclo da esporulação e induz a expressão de genes cujos produtos são necessários para a formação do córtex e da capa cortical do esporo (Eichenberger et al., 2004) (Mechanisms et al., 2016). Além disso, foram identificados genes regulados pelo fator Sigma-E, encontrando-se várias proteínas envolvidas em mecanismos importantes na resistência ao calor (Eichenberger et al., 2003). Finalmente, o sensor quinase de esporulação do sistema de dois componentes permite que as bactérias respondam rapidamente às mudanças em seu ambiente, levando à ativação ou repressão de genes específicos. Esse sistema de transdução de sinais é característico de organismos que possuem a capacidade de sobreviver e prosperar em uma ampla variedade de condições ambientais (Fabret et al., 1999) (Stephenson et al., 2000).

O entendimento da resposta ao estresse das células vegetativas é de vital importância, já que esse processo poderia conduzir à geração de esporos mais resistentes (Periago et al., 2002). Essas bactérias desenvolvem redes adaptativas para enfrentar os desafios do meio ambiente e sobreviver. É importante ressaltar que todas as respostas adaptativas envolvem uma série de mudanças genéticas que controlam as mudanças metabólicas. Deste modo, tratamentos térmicos suaves poderiam levar a uma adaptação da membrana celular, mediante mecanismos regulatórios. Vários estudos têm demonstrado que quando a célula bacteriana é submetida a altas temperaturas, um grupo de proteínas denominadas proteínas do choque térmico (HSPs) são rapidamente induzidas. Deste modo, no **Apêndice F** pode-se observar as proteínas relacionadas às células vegetativas. Entre estas proteínas, foram observadas as HSPs como: as chaperones moleculares (DnaK, DnaJ, GroEL) e as proteases (ClpP, ClpL e ClpX). Por outro lado, pôde-se observar também proteínas induzíveis por dano e entre outras proteínas de resposta ao estresse.

Ao realizar uma análise da frequência das proteínas por cepas (**Apêndice C**), observou-se que a ocorrência das PBPs (tipo transglicosilase, transpeptidase, endopeptidase) foi maior na cepa C. Assim, as proteínas do exósporo e de esporulação foram menos frequentes na cepa A. Da mesma forma, as proteínas da fase 5 da esporulação (**Apêndice D**) foram consideravelmente menos frequentes na cepa A. No **Apêndice E** não se observou diferença relevante na frequência das proteínas entre as cepas A, B, C e D. Por último, as proteases (**Apêndice F**), que são induzidas pelo choque térmico, foram menos frequentes na cepa A em comparação às outras. Embora diferenças entre as demais proteínas também tenham sido observadas, foram consideradas só aquelas em que se observou uma diferença relativamente maior de ocorrência.

4. CONCLUSÕES

Não obstante a comunidade de bactérias esporuladas mesófilas tenha sido maioritariamente do gênero *Bacillus*, a mesma apresentou uma complexa diversidade de genótipos e fenótipos bacterianos, indicando o risco de persistir no produto final ou ser fonte de contaminação para outros produtos quando fosse utilizado como ingrediente. Foi possível verificar também que a espécie predominante esteve representada por espécies do grupo *Bacillus cereus* e que sua persistência no produto final poderia significar um risco na inocuidade do produto e segurança do consumidor. A maioria das bactérias que compõem a comunidade isolada a partir de amostras de matéria-prima e produto final de ovo líquido pasteurizado possuem características relacionadas ao potencial de resistência ao calor baseado nos ensaios fenotípicos e genotípicos, e sua redução por métodos térmicos

representaria um problema pois o ovo está composto por proteínas sensíveis ao calor.

Todos os genes testados neste trabalho envolveram mecanismos que permitiram aos esporos resistir aos tratamentos térmicos, o que quer dizer que estes genes poderiam ser utilizados para posteriores trabalhos como biomarcadores para a detecção de bactérias formadoras de esporos mesófilos potencialmente resistentes ao calor. Assim mesmo, podemos concluir que os genes associados a mecanismos de resistência ao calor não foram os mesmos frente aos diferentes tratamentos térmicos, revelando o complexo que resultaria sua eliminação/redução na indústria de alimentos. Já que não somente teria os nutrientes necessários para proliferar, mas também a presença de uma rede de mecanismos para sobreviver bastante evoluído frente a altas temperaturas. Mas este tipo de estudos melhora o entendimento da resposta ao estresse e deste jeito ajuda a determinar medidas preventivas/corretivas frente a este tipo de ameaça.

Por último, precauções devem ser tomadas no momento de transportar a matéria prima, mantendo as condições de refrigeração adequadas, que evitem a proliferação de micro-organismos. Além, de utilizar pré-tratamentos que muito longe de favorecer à adaptação e proliferação permita reduzir a capacidade de resistência e leve a eliminação das células vegetativas. Devido, a que se observou uma maior redução da população do produto final GLF, após os tratamentos térmicos, sugeri que provavelmente o uso de pH ácido em sinergia com a pasteurização poderiam conduzir a uma redução mais eficiente da comunidade de bactérias esporuladas isoladas de ovo líquido pasteurizado resfriado.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abee, T., Wouters, J.A., 1999. Microbial stress response in minimal processing. **Int. J. Food Microbiol.** 50, 65–91. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(99\)00078-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(99)00078-1)
- Altschul, S.F., 2006. BLAST Algorithm. *Encycl. Life Sci.* 1–5. <https://doi.org/10.1038/npg.els.0005253>
- Alvarenga, V.O., Brancini, G.T.P., Silva, E.K., da Pia, A.K.R., Campagnollo, F.B., Braga, G.Ú.L., Hubinger, M.D., Sant’Ana, A.S., 2018a. Survival variability of 12 strains of *Bacillus cereus* yielded to spray drying of whole milk. **Int. J. Food Microbiol.** 286, 80–89. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.07.020>
- Alvarenga, V.O., Campagnollo, F.B., Pia, A.K.R., Conceição, D.A., Abud, Y., Sant’Anna, C., Hubinger, M.D., Sant’Ana, A.S., 2018b. Quantifying the responses of three *Bacillus cereus* strains in isothermal conditions and during spray drying of different carrier agents. **Front. Microbiol.** 9, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01113>
- André, S., Vallaëys, T., Planchon, S., 2017. Spore-forming bacteria responsible for food spoilage. **Res. Microbiol.** 168, 379–387. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2016.10.003>
- Aouadhi, C., Maaroufi, A., Mejri, S., 2014. Incidence and characterisation of aerobic spore-forming bacteria originating from dairy milk in Tunisia. **Int. J. Dairy Technol.** 67, 95–102. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12088>
- Aouadhi, C., Rouissi, Z., Kmiha, S., Mejri, S., Maaroufi, A., 2016. Effect of sporulation conditions on the resistance of *Bacillus sporothermodurans* spores to nisin and heat. **Food Microbiol.** 54, 6–10. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.10.005>
- Apetroaie-Constantin, C., Mikkola, R., Andersson, M.A., Teplova, V., Suominen, I., Johansson, T., Salkinoja-Salonen, M., 2009. *Bacillus subtilis* and *B. mojavensis* strains connected to food poisoning produce the heat stable toxin amyloisin. **J. Appl. Microbiol.** 106, 1976–1985. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04167.x>
- Aragon-Alegro, L.C., Souza, K.L. de O., Costa Sobrinho, P. de S., Landgraf, M., Destro, M.T., 2005. Avaliação da qualidade microbiológica de ovo integral pasteurizado produzido com e sem a etapa de lavagem no processamento. **Ciência e Tecnol. Aliment.** 25, 618–622. <https://doi.org/10.1590/s0101-20612005000300036>
- Asai, K., Takamatsu, H., Iwano, M., Kodama, T., Watabe, K., Ogasawara, N., 2001. The *bacillus subtilis* yabQ gene is essential for formation of the spore cortex. **Microbiology** 147, 919–927. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-4-919>
- Baron F. and Jan S., 2011. Improving the safety and quality of eggs and egg products, Improving the Safety and Quality of Eggs and Egg Products. Woodhead Publishing Limited. <https://doi.org/10.1533/9780857093929>
- Baron, F., Jan, S., 2010. Microbiologie de l’œuf et des ovoproduits. **Prod. Anim.** 23, 193–204. <https://doi.org/10.20870/productions-animales.2010.23.2.3300>
- Baxter, R., Holzapfel, W.H., 1982. A Microbial Investigation of Selected Spices, Herbs, and Additives in South Africa. **J. Food Sci.** 47, 570–574. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1982.tb10125.x>

- Berendsen, E.M., Boekhorst, J., Kuipers, O.P., Wells-Bennik, M.H.J., 2016a. A mobile genetic element profoundly increases heat resistance of bacterial spores. **ISME J.** 10, 2633–2642. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.59>
- Berendsen, E.M., Boekhorst, J., Kuipers, O.P., Wells-Bennik, M.H.J., 2016b. A mobile genetic element profoundly increases heat resistance of bacterial spores. **ISME J.** 10, 2633–2642. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.59>
- Berendsen, Koning, R.A., Boekhorst, J., Jong, A., Kuipers, O.P., Wells-Bennik, M.H.J., 2016. High-level heat resistance of spores of *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus licheniformis* results from the presence of a spoVA operon in a Tn 1546 transposon bacterial strains used in this study. 7, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01912>
- Berthold-Pluta, Pluta, Garbowska, Stefańska, 2019. Prevalence and toxicity characterization of *Bacillus cereus* in food products from Poland. **Foods** 8, 269. <https://doi.org/10.3390/foods8070269>
- Bilung, L.M., Tahar, A.S., Shze, T.P., Jamie, S.V.F.A., Hashim, H.F., Apun, K., Radu, S., 2016. Enumeration and molecular detection of *Bacillus cereus* in local indigenous and imported rice grains. **Agric. Food Secur.** 5, 4–8. <https://doi.org/10.1186/s40066-016-0074-4>
- Biosystems, A., 2002. BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. **Plant Mol. Biol. Report.** 20, 187–187. <https://doi.org/10.1007/BF02799434>
- Blakey, L.J., Prlestit, F.G., 1980. The Occurrence of *Bacillus cereus* in some Dried Foods Including Pulses and Cereals.
- Braja, D., 2012. Processamento, pasteurização, desidratção e outros processos similares de conservação de ovos de consumo. 39–37, 66 עלון הנוטע.
- Bukowska-Faniband, E., 2015. On the role of penicillin-binding protein SpoVD in endospore cortex assembly.
- Bukowska-Faniband, E., Hederstedt, L., 2017. Transpeptidase activity of penicillin-binding protein SpoVD in peptidoglycan synthesis conditionally depends on the disulfide reductase StoA. **Mol. Microbiol.** 105, 98–114. <https://doi.org/10.1111/mmi.13689>
- Bukowska-Faniband, E., Hederstedt, L., 2013. Cortex synthesis during *Bacillus subtilis* sporulation depends on the transpeptidase activity of SpoVD. **FEMS Microbiol. Lett.** 346, 65–72. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12202>
- Burgess, S.A., Lindsay, D., Flint, S.H., 2010a. Thermophilic bacilli and their importance in dairy processing. **Int. J. Food Microbiol.** 144, 215–225. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.09.027>
- Burgess, S.A., Lindsay, D., Flint, S.H., 2010b. Thermophilic bacilli and their importance in dairy processing. **Int. J. Food Microbiol.** <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.09.027>
- Carlin, F., Nguyen-The, C., 2013. Pathogen update: *Bacillus* species, Advances in Microbial Food Safety. Woodhead Publishing Limited. <https://doi.org/10.1533/9780857098740.2.70>
- Chechinska, A., Paszczynski, A., Burbank, M., 2015. *Bacillus* and Other Spore-Forming Genera: Variations in Responses and Mechanisms for Survival. **Annu. Rev. Food Sci. Technol.** 6, 351–369. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030713-092332>

- Clarridge, J.E., 2004. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. **Clin. Microbiol. Rev.** 17, 840–862. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.4.840-862.2004>
- Coleman, W.H., Chen, D., Li, Y.Q., Cowan, A.E., Setlow, P., 2007. How moist heat kill spores of *Bacillus subtilis*. **J. Bacteriol.** 189, 8458–8466. <https://doi.org/10.1128/JB.01242-07>
- Cortezão, M., Fuchs, F.M., Commichau, F.M., Eichenberger, P., Schuerger, A.C., Nicholson, W.L., Setlow, P., Moeller, R., 2019. *Bacillus subtilis* spore resistance to simulated mars surface conditions. **Front. Microbiol.** 10, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00333>
- Dark, M.J., 2013. Whole-genome sequencing in bacteriology: State of the art. **Infect. Drug Resist.** 6, 115–122. <https://doi.org/10.2147/IDR.S35710>
- den Besten, H.M.W., Berendsen, E.M., Wells-Bennik, M.H.J., Straatsma, H., Zwietering, M.H., 2017. Two complementary approaches to quantify variability in heat resistance of spores of *Bacillus subtilis*. **Int. J. Food Microbiol.** <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.04.014>
- Driks, A., Setlow, P., 2014. Morphogenesis and Properties of the Bacterial Spore. **Prokaryotic Dev.** 191–218. <https://doi.org/10.1128/9781555818166.ch9>
- Duc, L.H., Dong, T.C., Logan, N.A., Sutherland, A.D., Taylor, J., Cutting, S.M., 2005. Cases of emesis associated with bacterial contamination of an infant breakfast cereal product. **Int. J. Food Microbiol.** 102, 245–251. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.11.022>
- EFSA, 2014. Scientific Opinion on the public health risks of table eggs due to deterioration and development of pathogens. **EFSA J.** 12, 3782. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3782>
- Ehling-Schulz, M., Lereclus, D., Koehler, T.M., 2019. The *Bacillus cereus* Group: *Bacillus* Species with Pathogenic Potential, Microbiology Spectrum. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.gpp3-0032-2018>
- Eichenberger, P., Fujita, M., Jensen, S.T., Conlon, E.M., Rudner, D.Z., Wang, S.T., Ferguson, C., Haga, K., Sato, T., Liu, J.S., Losick, R., 2004. The program of gene transcription for a single differentiating cell type during sporulation in *Bacillus subtilis*. **PLoS Biol.** 2. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020328>
- Eichenberger, P., Jensen, S.T., Conlon, E.M., Van Ooij, C., Silvaggi, J., González-Pastor, J.E., Fujita, M., Ben-Yehuda, S., Stragier, P., Liu, J.S., Losick, R., 2003. The σ^E regulon and the identification of additional sporulation genes in *Bacillus subtilis*. **J. Mol. Biol.** 327, 945–972. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(03\)00205-5](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(03)00205-5)
- Fabret, C., Feher, V.A., Hoch, J.A., 1999. Two-component signal transduction in *Bacillus subtilis*: How one organism sees its world. **J. Bacteriol.** 181, 1975–1983. <https://doi.org/10.1128/jb.181.7.1975-1983.1999>
- Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. **Evolution** (N. Y). 39, 783–791. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x>
- Fogele, B., Granta, R., Valciņa, O., Bērziņš, A., 2018. Occurrence and diversity of *Bacillus cereus* and moulds in spices and herbs. **Food Control** 83, 69–74. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.05.038>
- From, C., Pukall, R., Schumann, P., Granum, P.E., 2005. Toxin-Producing Ability among.

Society 71, 1178–1183. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.3.1178>

Garde, S., Brea, L., Torres, N.G., Arribas, M.Á., 2018. Spore - forming bacteria in dairy products.

Goulart M. C., Cueva L.G., Attili D., F.F., 2019. Microbial Probiotics for Agricultural Systems, in: Zúñiga-Dávila, D., González-Andrés, F., Ormeño-Orrillo, E. (Eds.), Sustainability in Plant and Crop Protection. Springer International Publishing, Cham. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-17597-9>

Grosset, L., Baron, F., Cochet, O., Briandet, R., Dessaigne, S., Chevalier, S.E.V., Gautier, M., Jan, S., 2007. Isolation and Characterization of a Psychrotolerant Toxin Producer, *Bacillus weihenstephanensis*, in Liquid Egg Products 70, 2782–2791.

Guinebretière, 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., 2013. *Bacillus cytotoxicus* sp. nov. is a novel thermotolerant species of the *Bacillus cereus* group occasionally associated with food poisoning. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 63, 31–40. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.030627-0>

Gupta, R.S., Bustard, K., Falah, M., Singh, D., 1997. Sequencing of heat shock protein 70 (DnaK) homologs from *Deinococcus proteolyticus* and *Thermomicrobium roseum* and their integration in a protein- based phylogeny of prokaryotes. **J. Bacteriol.** 179, 345– 357. <https://doi.org/10.1128/jb.179.2.345-357.1997>

Hackett, R.H., Setlow, P., 1988. Properties of spores of *Bacillus subtilis* strains which lack the major small, acid-soluble protein. **J. Bacteriol.** 170, 1403–1404. <https://doi.org/10.1128/jb.170.3.1403-1404.1988>

Hara-Kudo, Y., Takatori, K., 2009. Microbial quality of liquid egg and salmonella infection status in Japan. **J. Food Hyg. Sec. Japan** 50, 34–40. <https://doi.org/10.3358/shokueishi.50.34>

He, K., Xin, Y. ping, Shan, Y., Zhang, X., Song, H. hui, Fang, W. huan, 2019. Phosphorylation residue T175 in RsbR protein is required for efficient induction of sigma B factor and survival of *Listeria monocytogenes* under acidic stress. **J. Zhejiang Univ. Sci.** 20, 660–669. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1800551>

Hecker, M., Schumann, W., Volker, U., 1996. Heat-shock and general stress response in *Bacillus subtilis*.: DISCOVER: all subjects. **Mol. Microbiol.** 19, 417–428.

Henriques, A.O., Moran, C.P., 2007. Structure, Assembly, and Function of the Spore Surface Layers. **Annu. Rev. Microbiol.** 61, 555–588. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.61.080706.093224>

Heyndrickx, M., Scheldeman, P., 2008. Bacilli Associated with Spoilage in Dairy Products and Other Food. **Appl. Syst. Bacillus Relat.** 64–82. <https://doi.org/10.1002/9780470696743.ch6>

Hong, H.A., To, E., Fakhry, S., Baccigalupi, L., Ricca, E., Cutting, S.M., 2009. Defining the natural habitat of *Bacillus* spore-formers. **Res. Microbiol.** 160, 375–379. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2009.06.006>

Iciek, J., Papiewska, A., Molska, M., 2006. Inactivation of *Bacillus stearothermophilus* spores during thermal processing. **J. Food Eng.** 77, 406–410. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.07.005>

- Idris, A.B., Hassan, H.G., Salaheldin Ali, M.A., Eltaher, S.M., Idris, L.B., Altayb, H.N., Abass, A.M., Ibrahim, M.M.A., Ibrahim, E.A.M., Hassan, M.A., 2020. Molecular phylogenetic analysis of 16S rRNA sequences identified two lineages of *Helicobacter pylori* Strains detected from different regions in Sudan suggestive of differential evolution. **Int. J. Microbiol.** 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/8825718>
- Ifeoma, M.E., Onyekachi, O., 2013. Influence of incubation temperature, pH and food substrate on production of *Bacillus cereus* extracellular proteins and toxins. **African J. Microbiol. Res.** 7, 2050–2056. <https://doi.org/10.5897/ajmr12.1428>
- James, C., Lechevalier, V., Ketteringham, L., 2002. Surface pasteurisation of shell eggs. **J. Food Eng.** 53, 193–197. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(01\)00156-X](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(01)00156-X)
- Jan, S., Brunet, N., Techer, C., Le Maréchal, C., Koné, A.Z., Grosset, N., Cochet, M.F., Gillard, A., Gautier, M., Puterflam, J., Baron, F., 2011. Biodiversity of psychrotrophic bacteria of the *Bacillus cereus* group collected in farm and egg product industry. **Food Microbiol.** 28, 261–265. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.05.029>
- Keerthirathne, T.P., Ross, K., Fallowfield, H., Whiley, H., 2017. Reducing risk of salmonellosis through egg decontamination processes. **Int. J. Environ. Res. Public Health** 14. <https://doi.org/10.3390/ijerph14030335>
- Khaneja, R., Perez-Fons, L., Fakhry, S., Baccigalupi, L., Steiger, S., To, E., Sandmann, G., Dong, T.C., Ricca, E., Fraser, P.D., Cutting, S.M., 2010. Carotenoids found in *Bacillus*. **J. Appl. Microbiol.** 108, 1889–1902. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04590.x>
- Ki, S.L., Bumbaca, D., Kosman, J., Setlow, P., Jedrzejewski, M.J., 2008. Structure of a protein-DNA complex essential for DNA protection in spores of *Bacillus* species. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 105, 2806–2811. <https://doi.org/10.1073/pnas.0708244105>
- Kim, O.S., Cho, Y.J., Lee, K., Yoon, S.H., Kim, M., Na, H., Park, S.C., Jeon, Y.S., Lee, J.H., Yi, H., Won, S., Chun, J., 2012. Introducing EzTaxon-e: A prokaryotic 16s rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 62, 716–721. <https://doi.org/10.1099/ijls.0.038075-0>
- Kock, H., Hecker, M., 2004. Fine-Tuning in regulation of Clp protein content in. **Society** 186, 179–191. <https://doi.org/10.1128/JB.186.1.179>
- Kone, A.Z., Jan, S., Le Marechal, C., Grosset, N., Gautier, M., Puterflam, J., Baron, F., 2013a. Identifying risk factors for eggshell contamination by *Bacillus cereus* group bacteria in French laying farms. **Br. Poult. Sci.** 54, 298–305. <https://doi.org/10.1080/00071668.2013.783900>
- Kone, A.Z., Jan, S., Le Marechal, C., Grosset, N., Gautier, M., Puterflam, J., Baron, F., 2013b. Identifying risk factors for eggshell contamination by *Bacillus cereus* group bacteria in French laying farms. **Br. Poult. Sci.** 54, 298–305. <https://doi.org/10.1080/00071668.2013.783900>
- Kort, R., O'Brien, A.C., van Stokkum, I.H.M., Oomes, S.J.C.M., Crielaard, W., Hellingwerf, K.J., Brul, S., 2005. Assessment of heat resistance of bacterial spores from food product isolates by fluorescence monitoring of dipicolinic acid release. **Appl. Environ. Microbiol.** 71, 3556–64. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.7.3556-3564.2005>
- Kru, E., Hecker, M., 1998. Encodes a negative regulator of its own operon and other class III heat shock genes. **Society** 180, 6681–6688.

- Krüger, E., Völker, U., Hecker, M., 1994. Stress induction of *clpC* in *Bacillus subtilis* and its involvement in stress tolerance. **J. Bacteriol.** 176, 3360–3367. <https://doi.org/10.1128/JB.176.11.3360-3367.1994>
- Kumar, M., Prasanna, R., Lone, S., Padaria, J.C., Saxena, A.K., 2014. Cloning and expression of *dnaK* gene from *Bacillus pumilus* of hot water spring origin. **Appl. Transl. Genomics** 3, 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.atg.2013.10.001>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K., 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Mol. Biol. Evol.** 35, 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Kuwana, R., Yamamura, S., Ikejiri, H., Kobayashi, K., Ogasawara, N., Asai, K., Sadaie, Y., Takamatsu, H., Watabe, K., 2003. *Bacillus subtilis* spoVIF (*yjcC*) gene, involved in coat assembly and spore resistance. **Microbiology** 149, 3011–3021. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26432-0>
- Lavermicocca, P., Valerio, F., De Bellis, P., Sisto, A., Leguérinel, I., 2016. Sporeforming bacteria associated with bread production: Spoilage and toxigenic potential. **Food Hyg. Toxicol. Ready-to-Eat Foods** 275–293. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801916-0.00016-9>
- Lee, J.K., Movahedi, S., Harding, S.E., Waites, W.M., 2003. The effect of acid shock on sporulating *Bacillus subtilis* cells. **J. Appl. Microbiol.** 94, 184–190. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01816.x>
- Leuschner, R.G.K., Lillford, P.J., 2000. Effects of hydration on molecular mobility in phase-bright *Bacillus subtilis* spores. **Microbiology** 146, 49–55. <https://doi.org/10.1099/00221287-146-1-49>
- Leyva-Illades, J.F., Setlow, B., Sarker, M.R., Setlow, P., 2007. Effect of a small, acid-soluble spore protein from *Clostridium perfringens* on the resistance properties of *Bacillus subtilis* spores. **J. Bacteriol.** 189, 7927–7931. <https://doi.org/10.1128/JB.01179-07>
- Li, Y., Davis, A., Korza, G., Zhang, P., Li, Y.Q., Setlow, B., Setlow, P., Hao, B., 2012. Role of a SpoVA Protein in Dipicolinic Acid Uptake into Developing Spores of *Bacillus subtilis*. **J. Bacteriol.** 194, 1875–1884. <https://doi.org/10.1128/JB.00062-12>
- Liang, W.C., Wang, X.H., Lin, M.G., Lin, L.L., 2009. A 70-kDa molecular chaperone, DnaK, from the industrial bacterium *Bacillus licheniformis*: Gene cloning, purification and molecular characterization of the recombinant protein. **Indian J. Microbiol.** 49, 151–160. <https://doi.org/10.1007/s12088-009-0029-6>
- Lindbäck, T., Granum, P.E., 2008. Detection and Purification of *Bacillus cereus* Enterotoxins, in: Food-Borne Pathogens. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 15–26. <https://doi.org/10.1385/1-59259-990-7:015>
- Liu, Y., Lai, Q., Dong, C., Sun, F., Wang, L., Li, G., Shao, Z., 2013. Phylogenetic diversity of the *Bacillus pumilus* group and the marine ecotype revealed by multilocus sequence analysis. **PLoS One** 8, 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080097>
- Lorenz, T.C., 2012. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. **J. Vis. Exp.** 1–15. <https://doi.org/10.3791/3998>

- Lowe, T., Sharefkin, J., Yang, S.Q., Dieffenbach, C.W., 1990. A computer program for selection of oligonucleotide primers for polymerase chain reactions. **Nucleic Acids Res.** 18, 1757–1761. <https://doi.org/10.1093/nar/18.7.1757>
- Lv, R., Zou, M., Chantapakul, T., Chen, W., Muhammad, A.I., Zhou, J., Ding, T., Ye, X., Liu, D., 2019. Effect of ultrasonication and thermal and pressure treatments, individually and combined, on inactivation of *Bacillus cereus* spores. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 103, 2329–2338. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9559-3>
- Markland, S.M., Farkas, D.F., Kniel, K.E., Hoover, D.G., 2013. Pathogenic psychrotolerant sporeformers: An emerging challenge for low-temperature storage of minimally processed foods. **Foodborne Pathog. Dis.** 10, 413–419. <https://doi.org/10.1089/fpd.2012.1355>
- Markland, S.M., Hoover, D.G., 2016. *Bacillus cereus* Mechanisms of Resistance to Food Processing, The Diverse Faces of *Bacillus cereus*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-801474-5.00004-9>
- Martinez, L., Reeves, A., Haldenwang, W., 2010. Stressosomes formed in *Bacillus subtilis* from the RsbR protein of *Listeria monocytogenes* allow σ B activation following exposure to either physical or nutritional stress. **J. Bacteriol.** 192, 6279–6286. <https://doi.org/10.1128/JB.00467-10>
- Martinez, R.C.R., Alvarenga, V.O., Thomazini, M., Fávaro-Trindade, C.S., Sant’Ana, A. deS., 2016. Assessment of the inhibitory effect of free and encapsulated commercial nisin (Nisaplin®), tested alone and in combination, on *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus* in refrigerated milk. **LWT - Food Sci. Technol.** 68, 67–75. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.12.027>
- Mckenney, P.T., Driks, A., Eichenberger, P., 2013. The *Bacillus subtilis* endospore: Assembly and functions of the multilayered coat. **Nat. Rev. Microbiol.** 11, 33–44. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2921>
- Mechanisms, D., Sporulation, R., Factor, S., 2016. in the Firmicutes 88–95. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.01.006.Diverse>
- Melly, E., Genest, P.C., Gilmore, M.E., Little, S., Popham, D.L., Driks, A., Setlow, P., 2002. Analysis of the properties of spores of *Bacillus subtilis* prepared at different temperatures. **J. Appl. Microbiol.** 92, 1105–1115. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01644.x>
- Ministry of Agriculture, L. and S., 1991. Padrão de identidade e qualidade para ovo integral (Regulation of identity and quality for whole eggs) 8, 55.
- Montanhini, M.T.M., dos Santos Bersot, L., 2013. Avaliação do comportamento psicrotrófico e atividade lipolítica e proteolítica de *Bacillus cereus* isolado de produtos lácteos refrigerados. **Acta Sci. - Technol.** 35, 163–167. <https://doi.org/10.4025/actascitechnol.v35i1.13752>
- Movahedi, S., Waites, W., 2002. Cold shock response in sporulating *Bacillus subtilis* and its effect on spore heat resistance. **J. Bacteriol.** 184, 5275–5281. <https://doi.org/10.1128/JB.184.19.5275-5281.2002>
- Movahedi, S., Waites, W., 2000. A two-dimensional protein gel electrophoresis study of the heat stress response of *Bacillus subtilis* cells during sporulation. **J. Bacteriol.** 182, 4758–4763. <https://doi.org/10.1128/JB.182.17.4758-4763.2000>

- Nakano, M., 2018. Multiplex PCR for rapid detection of thermophilic *Moorella thermoacetica* and *Geobacillus stearothermophilus* from canned foods and beverages. *Int. J. Food Sci. Technol.* 53, 1352–1362. <https://doi.org/10.1111/jifs.13691>
- Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406–425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
- Nicholson, W. L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H.J., Setlow, P., 2000. Resistance of *Bacillus* Endospores to Extreme Terrestrial and Extraterrestrial Environments. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 548–572. <https://doi.org/10.1128/mmlbr.64.3.548-572.2000>
- Noor, R., Tabassum, N., Maniha, S.M., Tabassum, T., 2019. Stress Responses Within *Bacillus* Species Under Heat Shock 2, 148–153. <https://doi.org/10.31080/ASMI.2019.02.0316>
- Oliveira, R.B.A., Lopes, L.S., Baptista, R.C., Chinha, A.A.I.A., Portela, J.B., Nascimento, J.S., Costa, L.E.O., Cruz, A.G., Sant’Ana, A.S., 2018. Occurrence, populations, diversity, and growth potential of spore-forming bacteria in “requeijão cremoso.” *LWT -Food Sci. Technol.* 89, 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.10.029>
- Oliveira, R.B.A., Margalho, L.P., Nascimento, J.S., Costa, L.E.O., Portela, J.B., Cruz, A.G., Sant’Ana, A.S., 2016. Processed cheese contamination by spore-forming bacteria: A review of sources, routes, fate during processing and control. *Trends Food Sci. Technol.* <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.09.008>
- Oomes, S.J.C.M., van Zuijlen, A.C.M., Hehenkamp, J.O., Witsenboer, H., van der Vossen, J.M.B.M., Brul, S., 2007. The characterisation of *Bacillus* spores occurring in the manufacturing of (low acid) canned products. *Int. J. Food Microbiol.* 120, 85–94. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.06.013>
- Orsburn, B., Sucre, K., Popham, D.L., Melville, S.B., 2009. The SpmA/B and DacF proteins of *Clostridium perfringens* play important roles in spore heat resistance: Research Letter. *FEMS Microbiol. Lett.* 291, 188–194. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01454.x>
- Paidhungat, M., Setlow, B., Driks, A., Setlow, P., 2000. Characterization of spores of *Bacillus subtilis* which lack dipicolinic acid. *J. Bacteriol.* 182, 5505–5512. <https://doi.org/10.1128/JB.182.19.5505-5512.2000>
- Paredes-Sabja, D., Sarker, N., Setlow, B., Setlow, P., Sarker, M.R., 2008. Roles of DacB and Spm proteins in *Clostridium perfringens* spore resistance to moist heat, chemicals, and UV radiation. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 3730–3738. <https://doi.org/10.1128/AEM.00169-08>
- Patagundi, B.I., Shivasharan, C.T., Kaliwal, B.B., 2011. Isolation and Characterization of Pretense Producing Bacteria from Soil. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 31, 754–759. <https://doi.org/10.3746/jkfn.2002.31.5.754>
- Peña, W.E.L., de Andrade, N.J., Soares, N.F.F., Alvarenga, V.Ô.O., Rodrigues Junior, S., Granato, D., Giraldo Zuniga, A.D., de Souza Sant’Ana, A., 2014. Modelling *Bacillus cereus* adhesion on stainless steel surface as affected by temperature, pH and time. *Int. Dairy J.* 34, 153–158. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.08.006>

- Pereira, A.P.M., Sant'Ana, A.S., 2018a. Diversity and fate of spore forming bacteria in cocoa powder, milk powder, starch and sugar during processing: A review. **Trends Food Sci. Technol.** <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.04.005>
- Pereira, A.P.M., Sant'Ana, A.S., 2018b. Diversity and fate of spore forming bacteria in cocoa powder, milk powder, starch and sugar during processing: A review. **Trends Food Sci. Technol.** <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.04.005>
- Perez-Valdespino, A., Li, Y., Setlow, B., Ghosh, S., Pan, D., Korza, G., Feeherry, F.E., Doona, C.J., Li, Y.Q., Hao, B., Setlow, P., 2014. Function of the SpoVAEa and SpoVAF proteins of *Bacillus subtilis* spores. **J. Bacteriol.** 196, 2077–2088. <https://doi.org/10.1128/JB.01546-14>
- Periago, P.M., Periago, P.M., Abee, T., Abee, T., Wouters, J. a, Wouters, J. a, 2002. Identification of Proteins Involved in the Heat Stress Response of. **Society** 68, 3486–3495. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.7.3486>
- Phillips, J.L., Gnanakaran, S., 2015. A data-driven approach to modeling the tripartite structure of multidrug resistance efflux pumps. **Proteins Struct. Funct. Bioinforma.** 83, 46–65. <https://doi.org/10.1002/prot.24632>
- Pia, A.K.R., Pereira, A.P.M., Costa, R.A., Alvarenga, V.O., Freire, L., Carlin, F., Sant'Ana, A.S., 2019. The fate of *Bacillus cereus* and *Geobacillus stearothermophilus* during alkalization of cocoa as affected by alkali concentration and use of pre-roasted nibs. **Food Microbiol.** 82, 99–106. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.01.009>
- Piggot, P.J., 2004. Microbial development. *Trends Genet.* 1, 265. [https://doi.org/10.1016/0168-9525\(85\)90098-8](https://doi.org/10.1016/0168-9525(85)90098-8)
- Piggot, P.J., Hilbert, D.W., 2004. Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Curr. Opin. Microbiol.* 7, 579–586. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2004.10.001>
- Popham, D., Illades-Aguilar, B., Setlow, P., 1995. The *Bacillus subtilis* *dacB* gene, encoding penicillin-binding protein 5*, is part of a three-gene operon required for proper spore cortex synthesis and spore core dehydration. **J. Bacteriol.** 177, 4721–4729. <https://doi.org/10.1128/jb.177.16.4721-4729.1995>
- Popham, D.L., Gilmore, M.E., Setlow, P., 1999. Roles of low-molecular-weight penicillin-binding proteins in *Bacillus subtilis* spore peptidoglycan synthesis and spore properties. **J. Bacteriol.** 181, 126–132.
- Portnoy, B.L., Goepfert, J.M., Harmon, S.M., 1976. An outbreak of *Bacillus cereus* food poisoning resulting from contaminated vegetablesprouts. **Am. J. Epidemiol.** 103, 589–594. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a112263>
- Postollec, F., Mathot, A.G., Bernard, M., Divanac'h, M.L., Pavan, S., Sohier, D., 2012a. Tracking spore-forming bacteria in food: From natural biodiversity to selection by processes. **Int. J. Food Microbiol.** 158, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.004>

- Postollec, F., Mathot, A.G., Bernard, M., Divanac'h, M.L., Pavan, S., Sohier, D., 2012b. Tracking spore-forming bacteria in food: From natural biodiversity to selection by processes. **Int. J. Food Microbiol.** 158, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.004>
- Rabinowitz, P.M., Conti, L.A., 2010. Foodborne illness, 1st ed, Human-Animal Medicine. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-6837-2.00011-7>
- Raeymaekers, L., Wuytack, E.Y., Willems, I., Michiels, C.W., Wuytack, F., 2002. Expression of a P-type Ca²⁺-transport ATPase in *Bacillus subtilis* during sporulation. **Cell Calcium** 32, 93–103. [https://doi.org/10.1016/S0143-4160\(02\)00125-2](https://doi.org/10.1016/S0143-4160(02)00125-2)
- Raju, D., Waters, M., Setlow, P., Sarker, M.R., 2006. Investigating the role of small, acid-soluble spore proteins (SASPs) in the resistance of *Clostridium perfringens* spores to heat. **BMC Microbiol.** 6, 1–13. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-6-50>
- Ramirez-Peralta, A., Stewart, K.A. V., Thomas, S.K., Setlow, B., Chen, Z., Li, Y.Q., Setlow, P., 2012a. Effects of the SpoVT regulatory protein on the germination and germination protein levels of spores of *Bacillus subtilis*. **J. Bacteriol.** 194, 3417–3425. <https://doi.org/10.1128/JB.00504-12>
- Ramirez-Peralta, A., Zhang, P., Li, Y. qing, Setlow, P., 2012b. Effects of sporulation conditions on the germination and germination protein levels of *Bacillus subtilis* spores. **Appl. Environ. Microbiol.** 78, 2689–2697. <https://doi.org/10.1128/AEM.07908-11>
- Ranawat, P., Rawat, S., 2017. Stress response physiology of thermophiles. **Arch. Microbiol.** 199, 391–414. <https://doi.org/10.1007/s00203-016-1331-4>
- Raso, J., Barbosa-Cánovas, G. V., 2003. Nonthermal Preservation of Foods Using Combined Processing Techniques. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.** 43, 265–285. <https://doi.org/10.1080/10408690390826527>
- Reder, A., Höper, D., Gerth, U., Hecker, M., 2012. Contributions of individual σ B-dependent general stress genes to oxidative stress resistance of *Bacillus subtilis*. **J. Bacteriol.** 194, 3601–3610. <https://doi.org/10.1128/JB.00528-12>
- Réhault-Godbert, S., Guyot, N., Nys, Y., 2019. The golden egg: Nutritional value, bioactivities, and emerging benefits for human health. **Nutrients** 11, 1–26. <https://doi.org/10.3390/nu11030684>
- Remize, F., 2016. Spore-forming bacteria, the microbiological quality of food: Foodborne spoilers. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100502-6.00007-8>
- Rey, M.W., Ramaiya, P., Nelson, B.A., Brody-Karpin, S.D., Zaretsky, E.J., Tang, M., Lopez de Leon, A., Xiang, H., Gusti, V., Clausen, I.G., Olsen, P.B., Rasmussen, M.D., Andersen, J.T., Jørgensen, P.L., Larsen, T.S., Sorokin, A., Bolotin, A., Lapidus, A., Galleron, N., Ehrlich, S.D., Berka, R.M., 2004. Complete genome sequence of the industrial bacterium *Bacillus licheniformis* and comparisons with closely related *Bacillus* species. **Genome Biol.** 5. <https://doi.org/10.1186/gb-2004-5-10-r77>
- Ribeiro, J.C., Tamanini, R., Soares, B.F., De Oliveira, A.M., De Godoi Silva, F., Da Silva, F.F., Augusto, N.A., Beloti, V., 2016. Efficiency of boiling and four other methods for genomic DNA extraction of deteriorating spore-forming bacteria from milk. **Semin. Agrar.** 37, 3069–3078. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2016v37n5p3069>

- Ronimus, R.S., Parker, L.E., Morgan, H.W., Mesophilic, B., 1997. The utilization of RAPD-PCR for identifying thermophilic and mesophilic *Bacillus* species applied only to the following bacillus species: Bacil-. **FEMS Microbiol. Lett.** 147, 75–79.
- Rönner, U., Husmark, U., Henriksson, A., 1990. Adhesion of bacillus spores in relation to hydrophobicity. **J. Appl. Bacteriol.** 69, 550–556. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1990.tb01547.x>
- Rueckert, A., Ronimus, R.S., Morgan, H.W., 2005. Development of a rapid detection and enumeration method for thermophilic bacilli in milk powders. **J. Microbiol. Methods** 60, 155–167. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2004.09.008>
- Russell, A.D., 1990a. Bacterial spores and chemical sporicidal agents. **Clin. Microbiol. Rev.** 3, 99–119. <https://doi.org/10.1128/CMR.3.2.99>
- Sadiq, F.A., Flint, S., He, G.Q., 2018a. Microbiota of milk powders and the heat resistance and spoilage potential of aerobic spore-forming bacteria. **Int. Dairy J.** <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.06.003>
- Sadiq, F.A., Flint, S., He, G.Q., 2018b. Microbiota of milk powders and the heat resistance and spoilage potential of aerobic spore-forming bacteria. **Int. Dairy J.** 85, 159–168. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.06.003>
- Sadiq, F.A., Li, Y., Liu, T.J., Flint, S., Zhang, G., Yuan, L., Pei, Z., He, G.Q., 2016a. The heat resistance and spoilage potential of aerobic mesophilic and thermophilic spore forming bacteria isolated from Chinese milk powders. **Int. J. Food Microbiol.** <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.09.009>
- Salkinoja-Salonen, M.S., Vuorio, R., Andersson, M.A., Kämpfer, P., Andersson, M.C., Honkanen-Buzalski, T., Scoging, A.C., 1999. Toxigenic strains of *Bacillus licheniformis* related to food poisoning. **Appl. Environ. Microbiol.** 65, 4637–4645.
- Scheffers, D.J., 2005a. Dynamic localization of penicillin-binding proteins during spore development in *Bacillus subtilis*. **Microbiology** 151, 999–1012. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27692-0>
- Scheffers, D.J., 2005b. Dynamic localization of penicillin-binding proteins during spore development in *Bacillus subtilis*. **Microbiology** 151, 999–1012. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27692-0>
- Scheldeman, P., Herman, L., Foster, S., Heyndrickx, M., 2006. *Bacillus sporothermodurans* and other highly heat-resistant spore formers in milk. **J. Appl. Microbiol.** 101, 542–555. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02964.x>
- Schneider, K.R., Parish, M.E., Goodrich, R.M., Cookingham, T., 2004. Preventing Foodborne Illness: *Bacillus cereus* and *Bacillus anthracis*. **Univ. Florida** 1–5.
- Selby, K., Lindström, M., Somervuo, P., Heap, J.T., Minton, N.P., Korkeala, H., 2011. Important role of class I heat shock genes *hrcA* and *dnaK* in the heat shock response and the response to pH and NaCl stress of group I *Clostridium botulinum* strain ATCC 3502. **Appl. Environ. Microbiol.** 77, 2823–2830. <https://doi.org/10.1128/AEM.02633-10>

- Setlow, P., 2014. Spore Resistance Properties 1–14. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec>
- Setlow, P., 2006. Spores of *Bacillus subtilis*: Their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. **J. Appl. Microbiol.** 101, 514–525. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02736.x>
- Setlow, P., 1994. Mechanisms which contribute to the long-term survival of spores of *Bacillus* species. **J. Appl. Bacteriol.** 76, 49S–60S. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1994.tb04357.x>
- Setlow, P., Johnson, E.A., 2019. Spores and Their Significance, **Food Microbiology**. <https://doi.org/10.1128/9781555819972.ch2>
- Sharma, A., Satyanarayana, T., 2013. Comparative genomics of *Bacillus* species and its relevance in industrial microbiology. **Genomics Insights** 6, 25–36. <https://doi.org/10.4137/GEL.S12732>
- Singh, L.K., Dhasmana, N., Sajid, A., Kumar, P., Bhaduri, A., Bharadwaj, M., Gandotra, S., Kalia, V.C., Das, T.K., Goel, A.K., Pomerantsev, A.P., Misra, R., Gerth, U., Leppla, S.H., Singh, Y., 2015. ClpC operon regulates cell architecture and sporulation in *Bacillus anthracis*. **Environ. Microbiol.** 17, 855–865. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12548>
- Singh, M., Brar, J., 2016. Egg Safety in the Realm of Preharvest Food Safety. **Microbiol. Spectr.** 4, 1–14. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.pfs-0005-2014>
- Singh, O. V., 2017. The problem of spore - forming bacteria in food preservation and tentative solutions spore structure and associated mechanisms of resistance metabolic state of the spore 139–151.
- Soni, A., Oey, I., Silcock, P., Bremer, P., 2016. *Bacillus* Spores in the Food Industry: A Review on Resistance and Response to Novel Inactivation Technologies. **Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.** 15, 1139–1148. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12231>
- Soni, A., Oey, I., Silcock, P., Bremer, P.J., 2018. Impact of temperature, nutrients, pH and cold storage on the germination, growth and resistance of *Bacillus cereus* spores in eggwhite. **Food Res. Int.** 106, 394–403. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.01.006>
- Stephenson, K., Yamaguchi, Y., Hoch, J.A., 2000. The mechanism of action of inhibitors of bacterial two-component signal transduction systems. **J. Biol. Chem.** 275, 38900–38904. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006633200>
- Stevenson, K.E., Lembke, F., 2015. 23. Mesophilic Aerobic Endospore-Forming Bacilli, in: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. **American Public Health Association**. <https://doi.org/10.2105/MBEF.0222.028>
- Stewart, G.C., 2015. The Exosporium Layer of Bacterial Spores: a Connection to the Environment and the Infected Host. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 79, 437–457. <https://doi.org/10.1128/mmmbr.00050-15>
- Stoeckel, M., Lücking, G., Ehling-Schulz, M., Atamer, Z., Hinrichs, J., 2016. Bacterial spores isolated from ingredients, intermediate and final products obtained from dairies: thermal resistance in milk. **Dairy Sci. Technol.** 96, 569–577. <https://doi.org/10.1007/s13594-016-0279-0>
- Sunde, E.P., Setlow, P., Hederstedt, L., Halle, B., 2009. The physical state of water in bacterial spores. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 106, 19334–19339.

<https://doi.org/10.1073/pnas.0908712106>

Sunwoo, H.H., Gujral, N., 2015. Handbook of Food Chemistry. **Handb. Food Chem.** 1–27. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-41609-5>

Techer, C., Baron, F., Delbrassinne, L., Belaïd, R., Brunet, N., Gillard, A., Gonnet, F., Cochet, M.F., Grosset, N., Gautier, M., Andjelkovic, M., Lechevalier, V., Jan, S., 2014a. Global overview of the risk linked to the *Bacillus cereus* group in the egg product industry: Identification of food safety and food spoilage markers. **J. Appl. Microbiol.** 116, 1344–1358. <https://doi.org/10.1111/jam.12462>

Techer, C., Baron, F., Jan, S., 2014b. Spoilage of Animal Products: Microbial Spoilage of Eggs and Egg Products, Second Edi. ed, Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00371-2>

Techer, C., Daoud, A., Madec, M.N., Gautier, M., Jan, S., Baron, F., 2015a. Microbial quality of industrial liquid egg white: Assumptions on spoiling issues in egg-based chilled desserts. **J. Food Sci.** 80, M389–M398. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12764>

Techer, C., Daoud, A., Madec, M.N., Gautier, M., Jan, S., Baron, F., 2015b. Microbial quality of industrial liquid egg white: Assumptions on spoiling issues in egg-based chilled desserts. **J. Food Sci.** 80, M389–M398. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12764>

Techer, C., Jan, S., Gonnet, F., Grosset, N., Gautier, M., Baron, F., 2019a. Bacterial diversity on stainless steel surfaces of egg processing companies and potential of selected isolates to spoil liquid whole egg products. **J. Appl. Microbiol.** 127, 1501–1510. <https://doi.org/10.1111/jam.14403>

Techer, C., Jan, S., Gonnet, F., Grosset, N., Gautier, M., Baron, F., 2019b. Bacterial diversity on stainless steel surfaces of egg processing companies and potential of selected isolates to spoil liquid whole egg products. **J. Appl. Microbiol.** 127, 1501–1510. <https://doi.org/10.1111/jam.14403>

Tetz, G., Tetz, V., 2017. Introducing the sporobiota and sporobiome. **Gut Pathog.** 9, 1–6. <https://doi.org/10.1186/s13099-017-0187-8>

Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res.** 22, 4673–4680. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>

Tovar-Rojo, F., Chander, M., Setlow, B., Setlow, P., 2002. The products of the spoVA operon are involved in dipicolinic acid uptake into developing spores of *Bacillus subtilis*. **J. Bacteriol.** 184, 584–587. <https://doi.org/10.1128/JB.184.2.584-587.2002>

Turnbull, P.C.B., Jackson, P.J., Hill, K.K., Keim, P., Kolstø, A.B., Beecher, D.J., 2008. Longstanding Taxonomic Enigmas within the “*Bacillus cereus* group” are on the Verge of being Resolved by Far-reaching Molecular Developments: forecasts on the possible outcome by an ad hoc team. **Appl. Syst. Bacillus Relat.** 23–36. <https://doi.org/10.1002/9780470696743.ch3>

Velásquez, J., Schuurman-Wolters, G., Birkner, J.P., Abee, T., Poolman, B., 2014. *Bacillus subtilis* spore protein SpoVAC functions as a mechanosensitive channel. **Mol. Microbiol.** 92, 813–823. <https://doi.org/10.1111/mmi.12591>

- Ventura, M., Fitzgerald, G.F., Van Sinderen, D., 2005. Genetic and transcriptional organization of the *clpC* locus in *Bifidobacterium breve* UCC 2003. **Appl. Environ. Microbiol.** 71, 6282–6291. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.10.6282-6291.2005>
- Vepachedu, V.R., Setlow, P., 2005. Localization of SpoVAD to the inner membrane of spores of *Bacillus subtilis*. **J. Bacteriol.** 187, 5677–5682. <https://doi.org/10.1128/JB.187.16.5677-5682.2005>
- Viator, C.L., Cates, S.C., Karns, S.A., Muth, M.K., Noyes, G., 2016. Food safety practices in the egg products industry. **J. Food Prot.** 79, 1210–1215. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-15-520>
- Vieira, D.A.P., Cabral, L., Noronha, M.F., Júnior, G.V.L., Sant’Ana, A.S., 2019. Microbiota of eggs revealed by 16S rRNA-based sequencing: From raw materials produced by different suppliers to chilled pasteurized liquid products. **Food Control** 96, 194–204. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.09.016>
- Warda, A.K., den Besten, H.M.W., Sha, N., Abee, T., Nierop Groot, M.N., 2015. Influence of food matrix on outgrowth heterogeneity of heat damaged *Bacillus cereus* spores. **Int. J. Food Microbiol.** 201, 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.02.010>
- Warda, A.K., Tempelaars, M.H., Abee, T., Nierop Groot, M.N., 2016a. Recovery of heat treated *Bacillus cereus* spores is affected by matrix composition and factors with putative functions in damage repair. **Front. Microbiol.** 7, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01096>
- Warda, A.K., Tempelaars, M.H., Boekhorst, J., Abee, T., Groot, M.N.N., 2016b. Identification of CdnL, a putative transcriptional regulator involved in repair and outgrowth of heat-damaged *Bacillus cereus* spores. **PLoS One** 11, 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148670>
- Wells-Bennik, M.H.J., Eijlander, R.T., den Besten, H.M.W., Berendsen, E.M., Warda, A.K., Krawczyk, A.O., Nierop Groot, M.N., Xiao, Y., Zwietering, M.H., Kuipers, O.P., Abee, T., 2016. Bacterial Spores in Food: Survival, Emergence, and Outgrowth. **Annu. Rev. Food Sci. Technol.** 7, 457–482. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-041715-033144>
- Whiley, H., Ross, K., 2015. *Salmonella* and eggs: From production to plate. **Int. J. Environ. Res. Public Health** 12, 2543–2556. <https://doi.org/10.3390/ijerph120302543>
- Woldemeskel, S.A., Alvarez, L., Daitch, A.K., Zeinert, R., Bhargava, A., Gonzalez, D., Collier, J., Chien, P., Cava, F., Goley, E.D., 2019. The conserved transcriptional regulator CdnL is required for metabolic homeostasis and morphogenesis in *Caulobacter*. **BioRxiv** 1–25. <https://doi.org/10.1101/557637>
- Wood, S.L., Waites, W.M., 1988. Factors affecting the occurrence of *Bacillus cereus* in liquid whole egg. **Food Microbiol.** 5, 103–107. [https://doi.org/10.1016/0740-0020\(88\)90028-7](https://doi.org/10.1016/0740-0020(88)90028-7)
- Yoon, S.H., Ha, S.M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H., Chun, J., 2017. Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 67, 1613–1617. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001755>
- Zhu, J., Zhang, D., Zhou, X., Cui, Y., Jiao, S., Shi, X., 2019. Development of a pasteurization method based on radio frequency heating to ensure microbiological safety of liquid egg. **Food Control** 107035. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.107035>

6. APÊNDICES

Apêndice A. Descrição das bactérias esporuladas mesófilas de amostras de produtos de ovo líquido pasteurizado resfriado

CANDIDATE IDENTIFICATION	STRAIN CODES	SUPPLIERS	PRODUCT	PRE-TREATMENT
<i>Bacillus cereus</i>	5024 PF	Final product	Chilled Pasteurized Liquid Whole Egg	Final Product
	10130 F	Suppliers F	Pasteurized Liquid Whole Egg	Pateurization
	12129 G	Final product	Chilled Pasteurized Liquid Egg Yolk	Final Product
	10162 B	Suppliers B	Chilled Liquid Whole Egg	Hydrogen peroxide (up to 0.1%)
	10155 F	Suppliers F	Pasteurized Liquid Whole Egg	Pateurization
<i>Bacillus subtilis</i>	10062 A	Suppliers A	Pasteurized Liquid Whole Egg	Pasteurization+ hydrogen peroxide (up to 0.1%)
	2044 N	Several suppliers	Raw whole egg	Eggs processed after braking
	10034G	Final product	Chilled Pasteurized Liquid Egg Yolk	Final Product
	12042 PF	Final product	Chilled Pasteurized Liquid Whole Egg	Final Product
	10149 E	Suppliers E	Pasteurized Liquid Whole Egg	Pateurization
<i>Bacillus wiedmannii</i>	6008 E	Suppliers E	Pasteurized Liquid Whole Egg	Pateurization
	12108 B	Suppliers B	Chilled Liquid Whole Egg	Hydrogen peroxide (up to 0.1%)
	10078 B	Suppliers B	Chilled Liquid Whole Egg	Hydrogen peroxide (up to 0.1%)
	10105 B	Suppliers B	Chilled Liquid Whole Egg	Hydrogen peroxide (up to 0.1%)
	4009 F	Suppliers F	Pasteurized Liquid Whole Egg	Pateurization
<i>Bacillus safensis</i>	12135 A	Suppliers A	Pasteurized Liquid Whole Egg	Pasteurization+ hydrogen peroxide (up to 0.1%)
	4050 A	Suppliers A	Pasteurized Liquid Whole Egg	Pasteurization+ hydrogen peroxide (up to 0.1%)
	2004 C	Suppliers C	Chilled Liquid Whole Egg	None
	2014 B	Suppliers B	Chilled Liquid Whole Egg	Hydrogen peroxide (up to 0.1%)
	12080 F	Suppliers F	Pasteurized Liquid Whole Egg	Pateurization
<i>Bacillus paramycoides</i>	12097 C	Suppliers C	Chilled Liquid Whole Egg	None
	3049 F	Suppliers F	Pasteurized Liquid Whole Egg	Pateurization
	12075 B	Suppliers B	Chilled Liquid Whole Egg	Hydrogen peroxide (up to 0.1%)
	12084 PF	Final product	Chilled Pasteurized Liquid Whole Egg	Final Product
	12035 PF	Final product	Chilled Pasteurized Liquid Whole Egg	Final Product
<i>Bacillus siamensis</i>	10119 E	Suppliers E	Pasteurized Liquid Whole Egg	Pateurization
	4047 PF	Final product	Chilled Pasteurized Liquid Whole Egg	Final Product
	3003 A	Suppliers A	Pasteurized Liquid Whole Egg	Pasteurization+ hydrogen peroxide (up to 0.1%)
	10118 E	Suppliers E	Pasteurized Liquid Whole Egg	Pateurization
	4053 N	Several suppliers	Raw whole egg	Eggs processed after braking
<i>Bacillus siamensis</i>	3054 F	Suppliers F	Pasteurized Liquid Whole Egg	Pateurization
	4055 N	Several suppliers	Raw whole egg	Eggs processed after braking

	4093 PF	Final product	Chilled Pasteurized Liquid Whole Egg	Final Product
<i>Bacillus tropicus</i>	5068 A	Suppliers A	Pasteurized Liquid Whole Egg	Pasteurization+ hidrogen peroxide (up to 0.1%)
	4034 C	Suppliers C	Chilled Liquid Whole Egg	None
<i>Bacillus altitudinis</i>	2030 PF	Final product	Chilled Pasteurized Liquid Whole Egg	Final Product
<i>Lysinibacillus Boronitolerans</i>	10101 E	Suppliers E	Pasteurized Liquid Whole Egg	Pateurization
<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	3062 A	Suppliers A	Pasteurized Liquid Whole Egg	Pasteurization+ hidrogen peroxide (up to 0.1%)
	12131 C	Suppliers C	Chilled Liquid Whole Egg	None
	12147 G	Final product	Chilled Pasteurized Liquid Egg Yolk	Final Product
<i>Brevibacillus agri</i>	12120N	Several suppliers	Raw whole egg	Eggs processed after braking
	12127 A	Suppliers A	Pasteurized Liquid Whole Egg	Pasteurization+ hidrogen peroxide (up to 0.1%)
<i>Brevibacillus formosus</i>	1034F	Suppliers F	Pasteurized Liquid Whole Egg	Pateurization
<i>Bacillus licheniformis</i>	4077 C	Suppliers C	Chilled Liquid Whole Egg	None
<i>Bacillus albus</i>	10061 A	Suppliers A	Pasteurized Liquid Whole Egg	Pasteurization+ hidrogen peroxide (up to 0.1%)
	12139N	Several suppliers	Raw whole egg	Eggs processed after braking
<i>Bacillus paranthracis</i>	3078 B	Suppliers B	Chilled Liquid Whole Egg	Hidrogen peroxide (up to 0.1%)
	12089PF	Final product	Chilled Pasteurized Liquid Whole Egg	Final Product
	12124 B	Suppliers B	Chilled Liquid Whole Egg	Hidrogen peroxide (up to 0.1%)
<i>Bacillus flexus</i>	12112 PF	Final product	Chilled Pasteurized Liquid Whole Egg	Final Product

Apêndice B. Descrição das amostras da matéria – prima de ovo líquido pasteurizado

IDENTIFICAÇÃO MATÉRIA- PRIMA	GRANJA	DISTÂNCIA ATÉ A FÁBRICA DE PROCESSAMENTO DE OVO LÍQUIDO PASTEURIZADO (KM)
Fornecedor A	Gransete (Bastos)	~ 500
Fornecedor B	Mantiqueira (Mato Grosso)	~ 1500
Fornecedor C	Satoshi to (Sumaré)	~ 100
Fornecedor E	Kerovos (Espírito Santo)	~ 1000
Fornecedor F	COOPEAVI (Espírito Santo)	~ 1000
Ovo In Natura (N)	Vários Fornecedores	Variável

Apêndice C. Classificação e frequência dos genes que codificam proteínas estruturais identificadas na análise genômico de 4 cepas resistentes a 80°C/30min. (A), 90°C/10min. (B), 100°C/5min.(C) e 110°C/5min. (D).

STRUCTURAL PROTEINS	STRAINS			
	12097C	12129G	2014B	12135A
EXOSPORIUM				
Exosporium protein Exs (A-G)	8	9	9	8
Exosporium protein Exs (K, Y)	3	1	1	2
Exosporium leader peptide-containing protein	4	0	1	1
TOTAL	15	10	11	11
SURFACE	12097C	12129G	2014B	12135A
Spore surface glycoprotein Bcl (A-B)	2	3	2	2
TOTAL	2	3	2	2
CORTEX	12097C	12129G	2014B	12135A
Spore cortex-lytic enzyme SleB	3	2	2	2
Spore cortex biosynthesis protein YabQ	1	1	1	1
Spore cortex peptidoglycan biosynthesis regulator SpoVE	1	1	1	1
TOTAL	5	4	4	4
COAT	12097C	12129G	2014B	12135A
Spore coat protein (C, F, M, O, W, X, Y)	7	7	9	8
Inner spore coat protein (D, H)	3	2	2	2
Outer spore coat protein E	2	4	4	4
Spore coat protein Y/spore coat protein Z	0	1	1	0
Spore coat protein CotJA	1	0	1	0
Spore coat protein YsxE	1	2	1	2
Endospore coat-associated protein YheD	1	1	1	1
Endospore coat-associated protein YuthH	1	1	1	1
Spore coat-associated protein JC	0	0	0	1
Spore coat polysaccharide biosynthesis protein spsI	1	1	1	0
Spore coat-associated protein camelysin calY	1	0	0	0
Spore coat assembly protein yabG	1	0	0	0
TOTAL	19	19	21	19
SPORE MEMBRANE	12097C	12129G	2014B	12135A
Sporulation membrane protein YtaF	2	3	3	3
Sporulation membrane protein YtrH	1	1	1	1
Sporulation integral membrane protein YlbJ	1	1	1	1
Sporulation integral membrane protein Ytvl	1	1	1	1
GlsB/YeaQ/YmgE family stress response membrane protein	1	0	0	1
TOTAL	6	6	6	7
CARBOXYPEPTIDASE (PBPs)	12097C	12129G	2014B	12135A
D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase	6	8	8	7
D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase DacA	2	2	2	2
D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase DacB	1	2	2	3
Serine-type D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase DacF	1	1	1	1
Serine-type D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase DacA2	7	4	4	3
D-alanyl-D-alanine metallo-carboxypeptidase	0	3	2	3
TOTAL	17	20	19	19
TRANSGLYCOSYLASE/TRANSPeptIDASE/ENDOPEPTIDASE (PBPs)	12097C	12129G	2014B	12135A
Penicillin-binding protein 1A PBP1A	2	3	4	1

Penicillin-binding protein 3 PBP3	1	0	1	0
Penicillin-binding protein PbpX	0	3	3	3
TOTAL	3	6	8	4

	12097C	12129G	2014B	12135A
SPORULATION PROTEIN				
Sporulation protein YjcZ	8	8	8	8
Sporulation protein YpjB	1	1	1	1
Sporulation protein YtfJ	1	2	3	2
Sporulation protein YqfC	1	1	1	1
Sporulation protein YqfD	1	1	1	1
Sporulation protein YrzL	1	4	4	4
Sporulation protein YhaI	1	1	1	1
Sporulation protein YhbH	1	1	1	1
Sporulation protein YunB	1	1	1	1
Sporulation protein YabP	1	1	1	1
Sporulation protein YhbH	1	1	1	1
Sporulation protein cse60	1	1	1	1
Putative sporulation protein YtxC	1	1	1	1
Sporulation protein involved in spore envelope assembly	1	1	1	1
Sporulation protein SpoOM	1	1	0	1
Sporulation protein, YlmC/YmxH family	1	2	2	2
TOTAL	23	28	28	28
SPORE GERMINATION				
	12097C	12129G	2014B	12135A
Spore germination protein XA	0	2	2	3
Spore germination protein GerS(A-C)	3	4	4	3
Spore germination protein GerP(A-F)	10	11	12	12
Spore germination protein gerPA/gerPF	1	1	2	1
Spore germination protein GerAA	1	1	1	1
Spore germination protein GerAB	2	1	2	1
Spore germination protein GerAC	0	2	1	1
Spore germination protein GerQ (A, B)	2	4	3	4
Spore germination protein GerL(A-C)	4	3	3	3
Spore germination protein GerH (A-C)	2	2	0	0
Spore germination protein GerI (A, C)	1	3	2	2
Spore germination protein GerK (A-C)	2	1	1	1
Spore germination protein GerK (A, B, C)	3	2	2	2
Spore germination protein Ger (A, C, D)	7	2	4	1
Spore germination lipase LipC	2	2	1	2
Spore germination protein gerM	1	1	1	1
Spore germination protein GerY (A, C)	2	1	1	1
Spore germination protein YaaH	1	1	1	0
Spore germination protein YndE	1	1	1	0
Spore germination protein YpeB	1	1	1	1
Spore germination protein GerLC (Fragment)	0	0	0	1
TOTAL	46	46	45	41

Apêndice D. Classificação e frequência dos genes que codificam proteínas envolvidas nos estágios da esporulação identificadas na análise genômico de 4 cepas resistentes a 80°C/30min. (A), 90°C/10min. (B), 100°C/5min.(C) e 110°C/5min. (D).

STAGES OF SPORULATION		STRAINS			
STAGE 0	12097C	12129G	2014B	12135A	
Stage 0 sporulation protein (A, J)	3	2	2	2	
Stage 0 sporulation regulatory protein	1	1	2	3	
Stage 0 sporulation protein yaaT	0	1	1	1	
TOTAL	4	4	5	6	
STAGE II	12097C	12129G	2014B	12135A	
Stage II sporulation protein (B, D, M, P, Q)	5	7	7	7	
Stage II sporulation protein S (A, B)	1	1	1	1	
Stage II sporulation protein required for processing of pro-sigma-E (SpoIIR)	1	1	1	1	
Stage II sporulation serine phosphatase for sigma-F activation (SpoIIE)	1	1	1	1	
TOTAL	8	10	10	10	
STAGE III	12097C	12129G	2014B	12135A	
Stage III sporulation protein E	1	0	0	1	
Stage III sporulation protein D	1	0	0	1	
Stage III sporulation protein A (A-H)	8	7	9	9	
SpoIIJ-associated protein	0	0	1	1	
DNA translocase stage III sporulation protein	0	1	1	0	
TOTAL	10	8	11	12	
STAGE IV	12097C	12129G	2014B	12135A	
Stage IV sporulation protein (A, B)	2	1	1	1	
SpoIVB peptidase	0	0	1	1	
Stage IV sporulation protein SpoIVF (A, B)	2	2	2	2	
TOTAL	4	3	4	4	
STAGE V	12097C	12129G	2014B	12135A	
Stage V sporulation protein (B, D, E, G, S)	4	6	4	4	
Stage V sporulation protein A (A- F)	2	8	8	8	
Stage V sporulation protein AEB	1	2	2	2	
Stage V sporulation protein V (K, R, S)	2	3	4	4	
TOTAL	9	19	18	18	
STAGE VI	12097C	12129G	2014B	12135A	
Stage VI sporulation protein (D, F)	2	3	3	3	
SpoVID-dependent spore coat assembly factor SafA	2	2	2	2	
TOTAL	4	5	5	5	

Apêndice E. Classificação e frequência dos genes que codificam proteínas funcionais identificadas na análise genômico de 4 cepas resistentes a 80°C/30min. (A), 90°C/10min. (B), 100°C/5min.(C) e 110°C/5min. (D).

FUNCTIONAL PROTEINS	STRAINS			
	12097C	12129G	2014B	12135A
P-TYPE CALCIUM TRASPORT ATPase				
Calcium transporting ATPase (YloB gene)	1	1	2	2
TOTAL	1	1	2	2
SPORULATION LIPOPROTEIN	A	B	C	D
Sporulation lipoprotein YhcN/YlaJ	5	3	3	5
TOTAL	5	3	3	5
SMALL ACID-SOLUBLE SPORE	A	B	C	D
Small acid-soluble spore protein A (Major alpha-type SASP)	2	1	1	1
Small acid-soluble spore protein B (Major beta-type SASP)	3	3	2	2
Small acid-soluble spore protein F (Minor alpha/beta-type SASP)	1	1	1	1
Small, acid-soluble spore protein (H, I, K, N, O, P)	7	7	7	4
Small acid-soluble spore protein alpha/beta type	1	2	2	3
Small acid-soluble protein gamma-type	1	1	1	1
Small, acid-soluble spore protein Tlp	1	1	1	1
Small acid-soluble spore protein Sspl	0	0	0	1
TOTAL	16	16	15	14
SPORULATION REGULATORY	12097C	12129G	2014B	12135A
Regulatory protein Spx	0	1	0	0
SpoOE family sporulation regulatory protein-aspartic acid phosphatase	1	0	0	0
TOTAL	1	1	0	0
SPORE MATURATION	12097C	12129G	2014B	12135A
Spore maturation protein Spm (A, B)	2	2	2	2
Spore maturation protein CgeB	1	0	0	0
TOTAL	3	2	2	2
SPORULATION INITIATION	12097C	12129G	2014B	12135A
Sporulation initiation phosphotransferase (B, F)	2	2	2	1
TOTAL	2	2	2	1
DIPICOLINIC ACID SYNTHETASE	12097C	12129G	2014B	12135A
Dipicolinic acid synthetase subunit (A, B)	2	2	2	2
TOTAL	2	2	2	2
SPORULATION SIGMA	12097C	12129G	2014B	12135A
Sporulation sigma-E factor	1	2	1	1
RNA polymerase sporulation sigma factor SigF	0	1	0	0
Forespore regulator of the sigma-K	0	1	0	0
TOTAL	1	4	1	1
TRANSCRIPTIONAL REPRESSOR	12097C	12129G	2014B	12135A
Transcriptional repressor of sporulation and protease synthase	1	1	0	0

TOTAL	1	1	0	0
SPORE PROTEASE	12097C	12129G	2014B	12135A
Spore protease YyaC	1	1	1	1
TOTAL	1	1	1	1
SPORULATION KINASE	12097C	12129G	2014B	12135A
Sporulation kinase (A, D, E)	2	3	4	5
Sporulation histidine kinase inhibitor Sda	1	1	1	1
Sporulation kinase KinA	1	0	0	0
TOTAL	4	4	5	6
TWO-COMPONENT SYSTEM SPORULATION	12097C	12129G	2014B	12135A
Two-component system sporulation sensor kinase (B, D)	4	4	4	5
TOTAL	4	4	4	5

Apêndice F. Classificação e frequência de genes que codificam proteínas das células vegetativas identificadas na análise genômico de 4 cepas resistentes a 80°C/30min. (A), 90°C/10min. (B), 100°C/5min. (C) e 110°C/5min. (D).

VEGETATIVE CELL	STRAINS			
DAMAGE-INDUCIBLE	12097C	12129G	2014B	12135A
DNA damage response protein (A, B)	1	1	1	2
TOTAL	1	1	1	2
HEAT INDUCED	12097C	12129G	2014B	12135A
Heat-inducible transcriptional repressor HrcA	1	1	1	1
Heat induced stress protein YfiT	1	3	1	1
TOTAL	2	4	2	2
STRESS RESPONSE	12097C	12129G	2014B	12135A
Stress response protein CsbD	1	1	1	1
Stress response protein NhaX	1	0	1	1
TOTAL	2	1	2	2
MOLECULAR CHAPERONE	12097C	12129G	2014B	12135A
Molecular chaperone DnaK	1	2	2	1
Molecular chaperone DnaJ	2	2	2	2
Molecular chaperone Hsp20	2	2	2	2
Chaperone GroEL	1	1	1	1
Chaperone protein ClpB	1	1	1	1
Chaperone CsaA	1	1	1	1
TOTAL	8	9	9	8
GENERAL STRESS	12097C	12129G	2014B	12135A
General stress protein 13	1	1	1	1
General stress protein 17M	2	0	2	1
General stress protein 26	0	1	1	1
General stress protein, Gls24 family	0	0	1	0
TOTAL	3	2	5	3
PROTEASE	12097C	12129G	2014B	12135A
ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit Clp (P, L, X)	2	6	6	4
TOTAL	2	6	6	4
DNA REPAIR	12097C	12129G	2014B	12135A
DNA repair protein RecN	1	1	1	1
DNA repair exonuclease	1	1	1	1
TOTAL	2	2	2	2