

MAIKE TAÍS MAZIERO MONTANHINI

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE *Bacillus cereus* ISOLADO EM PRODUTOS LÁCTEOS COM RELAÇÃO AO SEU COMPORTAMENTO PSICROTRÓFICO

CURITIBA

2012

MAIKE TAÍS MAZIERO MONTANHINI

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE *Bacillus cereus* ISOLADO EM PRODUTOS LÁCTEOS COM RELAÇÃO AO SEU COMPORTAMENTO PSICROTRÓFICO

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Tecnologia de Alimentos pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Luciano dos Santos Bersot

CURITIBA

2012

Montanhini, Maíke Taís Maziero

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE *Bacillus cereus*
ISOLADO EM PRODUTOS LÁCTEOS COM RELAÇÃO AO SEU
COMPORTAMENTO PSICROTRÓFICO

Curitiba-PR, 2012. 80f.; il. pb; 29 cm.

Orientador: Prof. Dr. Luciano dos Santos Bersot
Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Programa de Pós-
Graduação em Engenharia de Alimentos.

1. Produtos lácteos refrigerados. 2. Protease. 3. Lipase. 4. Enterotoxina. 5. PCR. I.
Bersot, Luciano dos Santos. II. UFPR - PPGEAL. III. Título.

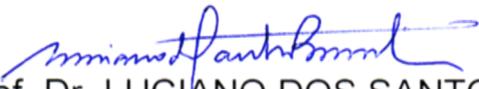
CDD 664.3

TERMO DE APROVAÇÃO

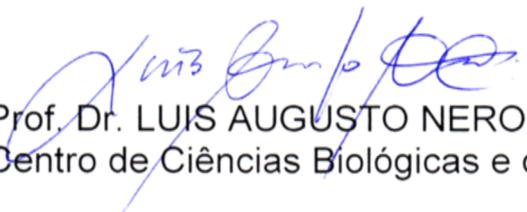
MAIKE TAÍS MAZIERO MONTANHINI

AVALIAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE *Bacillus cereus* ISOLADO EM PRODUTOS LÁCTEOS COM RELAÇÃO AO SEU COMPORTAMENTO PSICROTRÓFICO

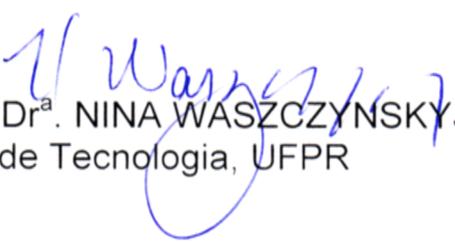
Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:


Orientador: Prof. Dr. LUCIANO DOS SANTOS BERSOT
Campus Palotina, UFPR


Prof.^a. Dr.^a. MARIA TERESA DESTRO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP


Prof. Dr. LUIS AUGUSTO NERO
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, UFV


Prof.^a. Dr.^a. JULIANA VITÓRIA MESSIAS BITTENCOURT
Campus Ponta Grossa, UTFPR


Prof.^a. Dr.^a. NINA WASZCZYŃSKYJ
Setor de Tecnologia, UFPR

Curitiba, 21 de março de 2012.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Prof. Luciano dos Santos Bersot, por seu auxílio, atenção e paciência.

Ao Prof. José Paes de Almeida Nogueira Pinto (UNESP, Botucatu), por sua contribuição no projeto de pesquisa.

Aos integrantes do Laboratório de Controle Microbiológico de Água e Alimentos (UFPR, Palotina) que colaboraram com este trabalho, em especial à Cibeli Viana, Cristina Maria Zanette e Juliano Pereira.

À Profa. Maria Teresa Destro, pelo treinamento promovido no Laboratório de Microbiologia de Alimentos (USP, São Paulo) e ao Vinicius da Cunha Barcellos, por toda atenção dispensada.

À Profa. Juliana Vitória Messias Bittencourt, por ter aberto as portas do Laboratório de Bioengenharia (UTFPR, Ponta Grossa) e ao Robson Rodrigo Miranda, pela ajuda na extração dos DNAs.

Ao Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos (UFPR, Curitiba), especialmente a Cristina Guolo, pelo auxílio nas provas bioquímicas.

Ao Paulo Marangoni (UFPR, Curitiba), pelo apoio nas análises de sequenciamento genético.

A todos do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos (UFPR, Curitiba) que me apoiaram durante estes quatro anos, especialmente a Suellen Jensen por sua amizade.

A Capes, por prover auxílio financeiro por meio de bolsa de estudos.

Ao CNPq pelo apoio financeiro fornecido a partir do Edital Universal (Edital MCT-CNPq nº 14/2009), processo 471703/2009-5.

A todos que, contribuíram direta ou indiretamente para a elaboração, execução e análise deste trabalho.

Ao meu marido Roberto, por me apoiar de todas as maneiras imagináveis: financeira, técnica e emocionalmente.

À Heloísa, que me deu o título mais importante da minha vida: o de mãe!

RESUMO

Bacillus cereus é uma bactéria termodúrica, patogênica, formadora de esporos e capaz de se multiplicar em temperatura de refrigeração. Este micro-organismo pode causar defeitos tecnológicos em produtos lácteos, devido à formação de lipases e proteases. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a ocorrência de *B. cereus* em amostras de produtos lácteos e caracterizar fenotípica e genotípicamente o comportamento psicrotrófico de isolados desta espécie. Para tanto, foram avaliadas 345 amostras de produtos lácteos obtidos no comércio, sendo 85 amostras de diversos produtos lácteos refrigerados, 110 amostras de leite UHT, 100 de leite pasteurizado e 50 de leite em pó. Foram utilizadas duas metodologias na detecção de *B. cereus*, uma qualitativa (enriquecimento seletivo) e outra quantitativa (semeadura). As colônias isoladas foram identificadas por provas bioquímicas e submetidas à avaliação do comportamento psicrotrófico, atividades lipolítica e proteolítica a 30 °C, 10 °C e 7 °C. A avaliação genotípica detectou via PCR a presença do gene *cspA*, assinaturas mesófila e psicrotrófica na região 16S rDNA em 63 estirpes. *B. cereus* foi detectado em 27 amostras utilizando o método quantitativo, com média de 1,46 Log UFC/mL ($\pm 0,47$) e em 74 amostras pelo método qualitativo, indicando que, na maioria das vezes, *B. cereus* está presente nos produtos lácteos em quantidades abaixo do limite de detecção do método quantitativo. Somente quatro (3,96%) estirpes se multiplicaram a 7 °C, no entanto, 85 (84,2%) estirpes se multiplicaram a 10 °C. As estirpes isoladas apresentaram elevada atividade proteolítica a 30 °C e a 10 °C, sendo a atividade lipolítica significativamente menor, nestas condições. A temperatura de 7 °C inibiu a produção de lipases e proteases. A determinação da temperatura ótima de produção de proteases por *B. cereus* indicou que esta foi máxima a 20 °C, sendo menor a 10 °C. Estirpes de *B. cereus* capazes de se multiplicar a 10 °C apresentaram potencial enterotoxigênico. Entre as 63 estirpes analisadas por PCR, 25 (39,7%) apresentaram o gene *cspA*; 38 apresentaram bandas mesófila e psicrotrófica no 16S rDNA, 24 apresentaram somente banda mesófila e uma apresentou somente banda psicrotrófica. Foi observada semelhança estatística somente entre os resultados de multiplicação a 30 °C e a presença de assinatura mesófila no 16S rDNA. A avaliação genotípica evidenciou que a presença do gene *cspA* ou de banda psicrotrófica no 16S rDNA não garantem o fenótipo psicrotrófico ao *B. cereus*, indicando que outros fatores contribuem na expressão desta característica.

Palavras-Chave: Produtos lácteos refrigerados, lipase, protease, enterotoxina, PCR.

ABSTRACT

Phenotypic and genotypic characterization of *Bacillus cereus* isolated from dairy products with regard to its psychrotrophic behavior

Bacillus cereus is a thermotolerant bacteria, pathogenic, spore-forming, and able to grow at chilling temperatures. This microorganism can cause technological defects in dairy products, due to the production of lipases and proteases. The present study aimed to evaluate the occurrence of *B. cereus* in dairy products samples and characterize its phenotype and genotype, regarding to the psychrotrophic behavior of isolated strains. Thus, 345 samples of dairy products obtained in the market were evaluated, among them 85 of several chilled dairy product, 110 samples of UHT milk, 100 of pasteurized milk and 50 of powder milk. Two methodologies were used in detection of *B. cereus*, one qualitative (selective enrichment) and other quantitative (direct plating). The isolated colonies were identified by biochemical tests and submitted to evaluation of the psychrotrophic behavior and lipolytic and proteolytic activity at 30 °C, 10 °C and 7 °C. The genotypic evaluation detected the presence of the *cspA* gene and mesophilic and psychrotrophic signatures in the 16S rDNA in 63 strains. *B. cereus* was detected in 27 samples using the quantitative method, with a mean of 1.46 Log CFU/ml (± 0.47) and 74 samples by the qualitative method, indicating that, in most cases, *B. cereus* is present in milk products in quantities below the detection limit of the quantitative method. Only four (3.96%) isolated strains grew at 7 °C, however, 85 (84.2%) strains grew at 10 °C. The isolates strains showed high proteolytic activity at 30 °C and 10 °C, with significantly lower lipase activity under these conditions. The temperature of 7 °C inhibited the production of lipases and proteases. The determination the optimum temperature for proteases production by *B. cereus* indicated that the maximal production was at 20 °C, being lower at 10 °C. *B. cereus* strains that were able to grow at 10 °C also showed enterotoxigenic potential. Among the 63 strains analyzed by PCR, 25 (39.7%) had the *cspA* gene; 38 showed mesophilic and psychrotrophic signatures for the 16S rDNA, 24 showed only mesophilic signature and one only psychrotrophic signature. Significant similarity was observed only between the results of multiplying at 30 °C and the presence of mesophilic signature for the 16S rDNA. The genotypic evaluation indicated that the presence of the gene *cspA* or psychrotrophic signature for the 16S rDNA do not ensure psychrotrophic phenotype to the *B. cereus*, indicating that other factors contribute to the expression of this characteristic.

Keywords: Chilled dairy products, lipase, protease, enterotoxin, PCR.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Diferenças fenotípicas do grupo <i>Bacillus cereus</i>	11
Tabela 2 – Doenças transmitidas por alimentos causadas por <i>Bacillus cereus</i>	13
Tabela 3 – Primers utilizados no experimento, com temperatura de pareamento e o tamanho do fragmento esperado.	39
Tabela 4 – Ocorrência de <i>B. cereus</i> em produtos lácteos refrigerados comercializados em Curitiba-PR no período de abril a junho/2009.	41
Tabela 5 – Ocorrência de <i>B. cereus</i> pelo método quantitativo e qualitativo em amostras de leite pasteurizado, leite em pó e leite UHT comercializadas nos estados do Paraná, São Paulo e Santa Catarina no período de março a dezembro de 2010.	42
Tabela 6 – Avaliação do comportamento psicrotrófico de estirpes de <i>B. cereus</i> isoladas de leite e derivados lácteos.....	45
Tabela 7 – Avaliação da atividade lipolítica de estirpes de <i>B. cereus</i> isoladas em amostras de leite e derivados lácteos em diferentes temperaturas.....	46
Tabela 8 – Avaliação da atividade proteolítica de estirpes de <i>B. cereus</i> isoladas em amostras de leite e derivados lácteos em diferentes temperaturas.....	47
Tabela 9 – Resultados fenotípicos e genotípicos de estirpes de <i>B. cereus sensu stricto</i> isoladas em produtos lácteos, de acordo com a atividade psicrotrófica...	52
Tabela 10 – Matriz de semelhança estatística, por análise multivariada de agrupamento, entre os resultados de análises genotípicas e fenotípicas de <i>B. cereus sensu stricto</i> isoladas em produtos lácteos.....	57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fluxograma de análise para identificação bioquímica de <i>B. cereus</i>	30
Figura 2 – Atividade proteolítica em diferentes temperaturas de diferentes estirpes de <i>B. cereus</i> isolado em produtos lácteos	49
Figura 3 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados por PCR do gene <i>cspA</i> de <i>B. cereus</i> isolados em produtos lácteos.....	53
Figura 4 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados por PCR duplex da região 16S rDNA de <i>B. cereus</i> isolados em produtos lácteos.....	55
Figura 5 – Dendrograma de comparação por grau de dissimilaridade entre as análises fenotípicas e genotípicas de estirpes de <i>B. cereus sensu stricto</i> isoladas em produtos lácteos, de acordo com a atividade psicrotrofica.	56
Figura 6 – Dendrograma de comparação por grau de dissimilaridade entre os produtos lácteos para os resultados fenotípicos e genotípicos de estirpes de <i>B. cereus sensu stricto</i> , de acordo com a atividade psicrotrofica.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS

AGL – ácidos graxos livres
BHI – infusão de cérebro e coração
BLAST – ferramenta de busca de local básico de alinhamento
cspA – gene da proteínas do choque-frio
CTAB – brometo de cetiltrimetilamônio
CytK – citotoxina K
D_x – tempo de resistência bacteriana à temperatura de x °C
DNA – ácido desoxirribonucléico
dNTPs – desoxirribonucleotídeos trifosfato
EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético
G – força gravitacional
Gly – glicina
HBL – toxina hemolítica BL
HTST – Alta Temperatura em Tempo Curto
IDF – International Dairy Federation
IN – Instrução Normativa
Log – logarítmo (base 10)
mEq – mili Equivalente
Mes. – mesófilo
Met – metionina
mol – quantidade de substância
mPCR – reação de cadeia de polimerase múltipla
mRNA – ácido ribonucléico mensageiro
MYP – ágar manitol gema de ovo polimixina
n – número de amostras
NHE – enterotoxina não-hemolítica
pb – pares de bases
PCR – reação de cadeia de polimerase
Phe – fenilalanina
Psci. – psicotrófico
rDNA – ácido desoxirribonucléico ribossômico
rpm – rotações por minuto

Ser – serina

TBE – tampão tris-borato-EDTA

TSA – ágar de soja triptona

TSB – caldo de soja triptona

U – unidade de enzima

UEP – unidade enzimática proteolítica

UFC – unidade formadora de colônias

UFPR – Universidade Federal do Paraná

UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

UHT – ultra alta temperatura

UV – ultravioleta

V – Voltz

VP – Voges-Proskauer

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Objetivo geral	2
1.2. Objetivos específicos	2
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Micro-organismos psicrotróficos.....	5
2.2. <i>Bacillus cereus</i>	9
2.2.1. Patogenicidade.....	13
2.2.2. Ocorrência em produtos lácteos.....	15
2.2.3. Fontes de contaminação	17
2.2.4. Estirpes psicrotróficas	18
2.2.5. Relação com problemas tecnológicos em produtos lácteos	21
2.2.6. Identificação genotípica de <i>B. cereus</i> psicrotrófico	24
3. MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1. Estudo sobre a ocorrência de <i>B. cereus</i> em produtos lácteos	27
3.1.1. Coleta de amostras	27
3.1.2. Análises microbiológicas	28
3.1.3. Identificação bioquímica de <i>B. cereus</i>	29
3.1.4. Análise dos resultados	32
3.2. Identificação do comportamento psicrotrófico e atividade proteolítica e lipolítica	32
3.2.1. Avaliação do comportamento psicrotrófico.....	33
3.2.2. Avaliação da atividade proteolítica	33
3.2.3. Avaliação da atividade lipolítica.....	33
3.2.4. Análise dos resultados	33
3.3. Determinação da temperatura ótima de produção de proteases	33
3.4. Avaliação do potencial enterotoxigênico de estirpes de <i>B. cereus</i> capazes de se multiplicar a 10 °C	35
3.5. Diferenciação genotípica de estirpes de <i>B. cereus</i> psicrotróficas	35
3.5.1. Extração do DNA.....	35
3.5.2. Detecção dos genes.....	37
3.5.3. Sequenciamento.....	39
3.6. Associação das características fenotípicas e genotípicas de <i>B. cereus</i> com relação ao seu comportamento psicrotrófico	40

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1. Estudo sobre a ocorrência de <i>B. cereus</i> em produtos lácteos	41
4.2. Identificação do comportamento psicrotrófico e atividade proteolítica e lipolítica ..	45
4.3. Determinação da temperatura ótima de produção de proteases	49
4.4. Avaliação do potencial enterotoxigênico de estirpes de <i>B. cereus</i> capazes de se multiplicar a 10 °C	51
4.5. Diferenciação genotípica de estirpes de <i>B. cereus</i> psicrotróficas	52
4.6. Associação das características fenotípicas e genotípicas de <i>B. cereus</i> com relação ao seu comportamento psicrotrófico	55
5. CONCLUSÃO	59
6. REFERÊNCIAS	60
ANEXO	79

1. INTRODUÇÃO

A refrigeração é uma das técnicas mais antigas utilizadas na conservação dos alimentos, capaz de manter a similaridade entre o valor nutricional e as propriedades sensoriais àquelas de alimentos *in natura*. O princípio da conservação dos alimentos pelo frio baseia-se na diminuição e, em alguns casos, na interrupção de reações químicas, atividades enzimáticas e metabólicas dos micro-organismos. No entanto, alguns micro-organismos, denominados psicotróficos, são capazes de manter sua atividade metabólica em condições de refrigeração. Consequentemente, mantêm seu potencial deteriorante mesmo em baixas temperaturas, comprometendo a eficiência da refrigeração como método de conservação de alimentos.

A indústria de produtos lácteos tem mostrado crescente preocupação com a presença de bactérias psicotróficas no leite, devido aos aspectos anti-tecnológicos e prejuízos econômicos que estas bactérias e suas enzimas causam no produto e seus derivados. A maioria das bactérias psicotróficas é destruída na pasteurização, com exceção das bactérias termodúricas, como *Bacillus* spp., que são formadoras de esporos, e resistem aos processos térmicos utilizados rotineiramente na fabricação dos alimentos. Por apresentar essas características, *Bacillus* spp. representa a maioria dos psicotróficos presentes nos produtos lácteos após o processamento térmico de pasteurização e ultra alta temperatura.

Neste contexto, *B. cereus* apresenta relevância por possuir conhecido potencial patogênico e deteriorante. Em condições favoráveis, esse micro-organismo produz enzimas que alteram os componentes dos produtos lácteos, conferindo características sensoriais indesejáveis. A demanda por produtos lácteos com prolongado prazo de validade, devido à crescente exigência dos consumidores quanto à qualidade dos alimentos, acaba sendo barrada pelos defeitos sensoriais que estas enzimas causam e pelos riscos à saúde pelas toxinas geradas.

Considerando a importância deste micro-organismo, por representar potencial risco à saúde pública e prejuízos à indústria laticinista brasileira, desenvolveu-se o presente trabalho, de modo a caracterizar *B. cereus* isolados em produtos lácteos.

1.1. Objetivo geral

O presente trabalho teve por objetivo caracterizar o comportamento psicrotrófico por análises fenotípicas e genotípicas de estirpes de *B. cereus* isoladas em produtos lácteos.

1.2. Objetivos específicos

- Estudo sobre a ocorrência de *B. cereus* em leite e derivados;
- Identificar o comportamento psicrotrófico, atividade lipolítica e proteolítica de *B. cereus* em diferentes temperaturas;
- Determinar a temperatura ótima de produção de proteases por *B. cereus*;
- Avaliar se estirpes de *B. cereus* capazes de se multiplicar a 10 °C apresentam potencial enterotoxigênico;
- Identificar a presença de genes específicos que caracterizam as estirpes psicrotróficas;
- Associar características fenotípicas e genotípicas relacionadas ao comportamento psicrotrófico de *B. cereus*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas (BRASIL, 2011). O leite é uma mistura homogênea de grande número de substâncias (carboidratos, lipídeos, proteínas, sais, vitaminas, enzimas, etc.), das quais algumas estão em emulsão (gordura e substâncias associadas), algumas em dispersão coloidal (caseínas ligadas a sais minerais) e outras em solução verdadeira (lactose, vitaminas hidrossolúveis, sais e outros) (McCARTHY e SINGH, 2009). O leite de vaca, o mais importante do ponto de vista comercial e industrial, é composto, em média, por 87,3% de água e 12,7% de sólidos totais, distribuídos da seguinte forma: 3,3% a 3,5% de proteínas totais, 3,5% a 3,8% de gordura, 4,9% de lactose, além de 0,7% de minerais e vitaminas (SGARBIERI, 2005).

O leite é um excelente meio de cultura para os micro-organismos devido às suas características intrínsecas, como alta atividade de água, pH próximo ao neutro e elevado valor nutritivo. A contaminação do leite pode ocorrer durante a ordenha, porém, as principais fontes de contaminação são os equipamentos utilizados durante a manipulação, transporte, processamento e armazenamento (SANTANA et al., 2001; FAGUNDES et al., 2006).

O leite pode veicular micro-organismos das famílias Pseudomonadaceae, Enterobacteriaceae, Micrococcaceae, Streptococcaceae, Bacillaceae, Lactobacillaceae, Propionibacteriaceae, Mycobacteriaceae, além de outros micro-organismos, sendo alguns deles patogênicos, como, por exemplo, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* e outros (MUIR, 1996; QUIGLEY et al., 2011).

A qualidade do leite produzido no Brasil, frequentemente, tem se mostrado em desacordo com os padrões microbiológicos regulamentados (NERO et al., 2005; PINTO et al., 2006; ARCURI et al., 2006; ZANELA et al., 2006; ROSA e QUEIROZ,

2007, MATTOS et al., 2010). Esta contaminação está intimamente relacionada com dois aspectos: fontes de contaminação microbiana e taxa de multiplicação dos micro-organismos contaminantes. Neste sentido, considera-se com relação ao primeiro aspecto, a saúde da glândula mamária, a microbiota do exterior do úbere, a contaminação dos equipamentos e a qualidade microbiológica da água; com relação ao segundo, considera-se o binômio tempo/temperatura em que o leite permanece desde a ordenha até o processamento (SILVEIRA et al., 1998; NASCIMENTO e SOUZA, 2002; NADA et al., 2012).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), com o objetivo de melhorar a qualidade do leite no país e aumentar as exportações de produtos lácteos, publicou a Instrução Normativa nº 51 (IN51), em 18 de setembro de 2002 (BRASIL, 2002). Recentemente a IN 51 foi revogada e substituída pela IN 62, de 29 de dezembro de 2011 (BRASIL, 2011). A IN62 prevê novos padrões microbiológicos para o leite cru refrigerado, leite pasteurizado e leite tipo A.

O leite cru deve ser mantido refrigerado na propriedade rural e tanques comunitários e atingir a temperatura de 4 °C em tanques de expansão ou 7 °C em tanques de imersão, num período não superior às 3h após o término da ordenha. A permanência do leite nas propriedades poderá ser de, no máximo, 48h, sendo recomendado como ideal um período de tempo não superior à 24h. O leite deve ser coletado em caminhões providos de tanques isotérmicos e encaminhado aos estabelecimentos industriais para o processamento. Neste tocante, permite-se que o leite cru refrigerado sofra uma oscilação de até 3 °C da temperatura original, não sendo permitido que ultrapasse 10 °C na plataforma de recepção da indústria (BRASIL, 2011).

O rápido abaixamento da temperatura do leite após a ordenha é uma das estratégias mais eficazes para garantir a boa qualidade microbiológica do produto (SANTOS e FONSECA, 2001; RAATS et al., 2011). Contudo, a refrigeração do leite por si só não é garantia de qualidade. É extremamente importante que o leite cru seja obtido em condições higiênico-sanitárias adequadas, objetivando a mínima

contaminação inicial. A estocagem deste produto em baixa temperatura (recomendado 4 °C) auxilia na manutenção da contagem microbiana em níveis baixos (FAGUNDES et al., 2006; NADA et al., 2012).

A refrigeração do leite na propriedade e o transporte a granel são medidas cuja implantação visa melhorar a qualidade microbiológica do leite produzido no país com relação às bactérias mesófilas. Entretanto, temperaturas de refrigeração selecionam a microbiota psicrotrófica, as quais continuam a se multiplicar nestas condições (SANTANA et al., 2001; PINTO et al., 2006). A refrigeração diminui a diversidade taxonômica da microbiota do leite cru, sendo esta composta em sua maioria, por bactérias psicrotróficas (RAATS et al., 2011).

2.1. Micro-organismos psicrotróficos

Bactérias psicrotróficas são micro-organismos deteriorantes e apresentam capacidade de multiplicação em temperatura de refrigeração (FAIRBAIRN e LAW, 1986; SORHAUG e STEPANIAK, 1997; ALMEIDA et al., 2000; SANTANA et al., 2001; McPHEE e GRIFFITHS, 2011). De acordo com a International Dairy Federation (IDF), psicrotróficos são definidos como sendo micro-organismos que podem desenvolver-se a 7 °C ou menos, independente da temperatura ótima de multiplicação.

A maioria dos psicrotróficos apresenta temperatura ótima de multiplicação entre 20 e 30 °C (MUIR, 1996; McPHEE e GRIFFITHS, 2011), ou seja, são micro-organismos mesófilos capazes de se adaptar ao frio alterando seu metabolismo.

Bactérias psicrotróficas apresentam multiplicação lenta. De uma maneira geral, o tempo de geração é de 14h a 10 °C. Ainda assim, em um dia, a população pode ser multiplicada por 10 a 4 °C e por 4 a 1 °C (FURTADO, 2005).

Os principais pontos de contaminação são os latões, tanques de expansão, água residual de equipamentos, utensílios de ordenha e tetos higienizados inadequadamente, sendo a água residual dos tanques de expansão e dos latões, os tetos higienizados inadequadamente e a clarificadora os pontos com maior

contagem de psicotróficos (SANTANA et al., 2001; FAGUNDES et al., 2006). Em condições adequadas de manipulação, este grupo de micro-organismos representa geralmente 10% da microbiota do leite cru (FAIRBAIRN e LAW, 1986). No entanto, quando ordenhado em condições precárias de higiene, as contagens de psicotróficos podem atingir mais de 75% da microbiota total do leite (NIELSEN, 2002; SERRA, 2004).

O metabolismo dos micro-organismos psicotróficos em temperaturas inferiores a 10 °C torna-se predominantemente lipo-proteolítico, expressando-se pela produção de enzimas intra e extracelulares (CELESTINO et al., 1996). A produção de enzimas hidrolíticas por bactérias psicotróficas é máxima na fase de crescimento exponencial ou estacionária (KOHLMANN et al., 1991; CHAMPAGNE et al., 1994).

Bactérias psicotróficas encontradas no leite e nos produtos lácteos não constituem um grupo taxonômico específico. As estirpes descritas pertencem aos dois grandes grupos de bactérias: Gram-negativas (*Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Serratia*, *Alcaligenes*, *Chromobacterium* e *Flavobacterium* spp.) e Gram-positivas (*Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* e *Microbacterium* spp.) (CHAMPAGNE et al., 1994; SORHAUG e STEPANIAK, 1997).

O gênero *Pseudomonas* é predominante entre os psicotróficos encontrados no leite (ALMEIDA et al., 2000; ERCOLINI et al., 2009), sendo as espécies *P. fluorescens* e *P. putida* as mais frequentemente isoladas (MARTINS et al., 2006). Eneroth et al. (1998) verificaram que espécies de *Pseudomonas* constituíram de 72% a 77% dos isolados obtidos em amostras de leite cru, leite pasteurizado e amostras de ambientes de indústrias de laticínios.

A partir de 8 °C inicia-se uma inversão da microbiota e ao atingir os 10 °C os micro-organismos Gram-positivos (em sua maioria termodúricas) tornam-se predominantes (STEPANIAK, 1991), com intensa ação deteriorante (MEER et al., 1991).

Os psicotróficos termodúricos são representados pelos gêneros *Arthrobacter*, *Microbacterium*, *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Clostridium* e principalmente pelo

Bacillus spp. (COLLINS, 1981; SORHAUG e STEPANIAK, 1997). Alguns autores sugerem que os psicrotróficos termodúricos do gênero *Bacillus* sejam variantes de organismos mesófilos que se adaptaram às baixas temperaturas (SHEHATA e COLLINS, 1971; ALMEIDA et al., 2000). As espécies de *Bacillus* mais frequentemente isoladas no leite e derivados são *B. stearothermophilus*, *B. licheniformis*, *B. coagulans*, *B. cereus*, *B. subtilis* e *B. circulans* (CHEN et al., 2003).

A maioria dos psicrotróficos é inativada pela pasteurização e/ou processos térmicos mais drásticos (CHAMPAGNE et al., 1994), contudo, psicrotróficos formadores de esporos do gênero *Bacillus* despertam interesse considerável na pesquisa do processamento de leite por resistirem a estes tratamentos (COLLINS, 1981; SORHAUG e STEPANIAK, 1997; CHEN et al., 2003).

As alterações dos componentes do leite em função da multiplicação dos microorganismos psicrotróficos limitam o prazo de validade dos produtos lácteos, devido a alterações no sabor, odor e aparência (SANTOS e FONSECA, 2001; MIGUEL et al., 2007), pela produção de proteases e lipases termorresistentes, que podem continuar atuando nos derivados lácteos mesmo após o a pasteurização rápida (HTST) ou processamento a ultra alta temperatura (UHT) (ADAMS et al., 1975; ANDERSON et al., 1979; ADAMS e BRAWLEY, 1981; STEAD, 1986; NORBERG et al., 2010).

Estirpes de *P. fluorescens* incubadas a 7, 22 e 32 °C apresentaram atividade proteolítica de 80%, 91% e 58% nas respectivas temperaturas, contudo, somente 7%, 44% e 7%, respectivamente, apresentaram atividade lipolítica nas mesmas temperaturas (WANG e JAYARAO, 2001).

A produção de proteases pelas bactérias é influenciada pelas condições físicas do ambiente. A produção de proteases por unidade de peso seco aumenta com a diminuição da temperatura, enquanto que o crescimento celular, abaixo de 20 °C, decai com a diminuição da temperatura. Este fato suporta a hipótese de que as bactérias psicrotróficas sintetizam maiores quantidades de enzimas a baixas temperaturas, a fim de compensar a redução da atividade enzimática e manter sua taxa de crescimento celular (FAIRBAIRN e LAW, 1986).

A ação das proteases, principalmente do gênero *Pseudomonas*, é similar à da quimosina, enzima empregada na coagulação enzimática para obtenção de queijos (PICARD et al., 1994). Esta atua sobre a κ -caseína, causando a ruptura do enlace Phe₁₀₅-Met₁₀₆, provocando a desestabilização e desnaturação das micelas de caseína, levando à formação de dois peptídeos: a para- κ -caseína, que permanece nas micelas de caseína, e o glicomacropéptido, formado pelos resíduos de aminoácidos 106 a 169 (TULLIO, 2007).

A ação deteriorante das proteases de micro-organismos psicotróficos é distinta entre as frações proteicas do leite. A κ -caseína é a fração mais susceptível à ação destas enzimas, seguida em menor escala pelas frações α e β -caseína, sendo que as proteínas do soro do leite (α -lactoalbumina e β -lactoglobulina) são resistentes ao ataque das proteases (SILVA, 2004).

As lipases produzidas por bactérias psicotróficas são resistentes às temperaturas de pasteurização HTST e ao tratamento UHT. A lipase produzida por *P. fluorescens* apresentou valores de D₁₀₀ 23,5 min e D₁₄₀ 2 min. Além de ser extremamente resistente ao calor, também é estável à desnaturação química (ANDERSON et al., 1979).

Outra enzima produzida por alguns psicotróficos, como *B. cereus* e algumas espécies de *Pseudomonas*, é a fosfolipase C. Esta enzima degrada a membrana dos glóbulos de gordura facilitando a ação das lipases sobre os triglicerídeos do leite (COUSIN, 1982; MUIR, 1996). Derivados lácteos com alto teor de gordura como cremes, queijos gordos e manteigas são os principais alvos da ação das lipases, as quais são capazes de provocar a rancidez (LAW, 1979; COUSIN, 1982).

No Brasil, alguns estudos evidenciaram valores altos nas contagens de psicotróficos, na ordem de 10⁵-10⁸ UFC/mL em leite cru refrigerado (SANTANA et al., 2001; PINTO et al., 2006; BERSOT et al., 2009; NÖRNBERG et al., 2010), no entanto, pouco se conhece a respeito da microbiota predominante e das propriedades hidrolíticas dessas bactérias.

Vários métodos têm sido sugeridos e pesquisados para o controle de psicotróficos no leite, entre os quais se destacam a refrigeração em temperaturas próximas a 0 °C por no máximo 24h, termização, carbonatação, microfiltração, bacto-fugação e inoculação de bactérias lácticas (CHAMPAGNE et al., 1994).

2.2. *Bacillus cereus*

B. cereus é uma bactéria amplamente encontrada na natureza, apresenta-se na forma de bastonete, Gram-positiva, aeróbia e formadora de esporo. Sua temperatura ótima de multiplicação varia de 25 a 37 °C, mas já foram identificadas estirpes psicotróficas e termodúricas capazes de multiplicar entre 3 e 75 °C (KRAMER e GILBERT, 1989; DROBNIEWSKI, 1993; DUFRENNE et al., 1995). Os mecanismos de adaptação de *B. cereus* às condições ambientais são muito diversos e contribuem para sua sobrevivência e disseminação no ambiente (CARLIN et al., 2010).

O grupo *B. cereus*, também denominado *B. cereus sensu lato*, compreende *B. cereus sensu stricto* e outras cinco espécies estreitamente relacionadas: *B. thuringiensis*, *B. anthracis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides* e *B. weihenstephanensis* (LECHNER et al., 1998; JENSEN et al., 2003; BARTOSZEWICZ et al., 2008; GUINEBRETIERE et al., 2008; SENESI e GHELARDI, 2010).

A taxonomia do “grupo *B. cereus*” ainda é bastante controversa. Alguns autores sugerem que estas espécies, por serem tão proximamente relacionadas, devem ser agrupadas como membros de uma única espécie (HENDRIKSEN et al., 2006; DIDELOT et al., 2009).

As espécies de *B. cereus sensu lato* podem ser classificadas como distintas devido essencialmente às suas características fenotípicas. *B. anthracis* caracterizam-se pelos fatores de patogenicidade de formação de cápsula (gene codificado no plasmídeo *pXO2*) e pela produção de toxinas (gene codificado pelo plasmídeo *pXO1*) que causam o carbúnculo hemático em humanos e animais,

doença conhecida como Antrax (ARNESEN et al., 2008). *B. thuringiensis* distingue-se pela produção de uma endotoxina produzida durante sua esporulação, que é utilizada comercialmente como inseticida. O aparecimento de colônias com crescimento rizoide em ágar é característico de *B. mycoides* e *B. pseudomycoides*, sendo que *B. weinenstephanensis* é constituída por estirpes psicrótróficas com multiplicação abaixo de 7 °C, mas não a 43 °C (LECHNER et al., 1998; ARNESEN et al., 2008).

Apesar de *B. antracis*, *B. cereus* e *B. thuringiensis* serem diferenciados por suas características fenotípicas e de patogenicidade, a sequência genômica indica que eles são estritamente relacionados: suas sequências do gene 16S rRNA apresentam mais de 99% de similaridade (ARNESEN et al., 2008). No entanto, alguns autores defendem que a classificação como “grupo *B. cereus*” deve ser redefinida, uma vez que estas espécies são suficientemente distintas para garantir uma nomenclatura própria coerente com suas designações taxonômicas, uma vez que o sistema atual pode causar confusão (PRIEST et al., 2004).

A confirmação das colônias típicas de *B. cereus* inclui dois grupos de testes: o primeiro para verificar se a colônia isolada pertence ao grupo *B. cereus* e o segundo para diferenciar *B. cereus* dos demais bacilos do grupo. Para confirmar se a cultura pertence ao grupo *B. cereus*, são aplicadas as provas bioquímicas de utilização anaeróbia da glicose, teste de decomposição da tirosina, teste de Voges-Proskauer, teste de redução do nitrato e teste de resistência à lisozima (Tabela 1). Para diferenciar *B. cereus* dos demais bacilos do grupo, os testes aplicados são a verificação da produção de cristais de toxinas intracelulares, verificação da motilidade, crescimento rizoide e atividade hemolítica (RHODEHAMEL e HARMON, 1998; BENNET e BELAY, 2001; SILVA et al., 2010).

Tabela 1 – Diferenças fenotípicas do grupo *Bacillus cereus*.

Fenótipo	<i>B. cereus</i>	<i>B. thuringiensis</i>	<i>B. mycoides</i>	<i>B. anthracis</i>
Coloração de Gram	Gram-positivo	Gram-positivo	Gram-positivo	Gram-positivo
Catalase	+	+	+	+
Motilidade	+/-	+/-	-	-
Redução de nitrato	+	+	+	+
Decomposição de tirosina	+	+	+/-	d
Resistência à lisozima	+	+	+	+
Reação de gema de ovo	+	+	+	+
Utilização anaeróbia de glicose	+	+	+	+
Reação de Voges-Proskauer	+	+	+	+
Produção de ácido a partir de manitol	-	-	-	-
Atividade hemolítica	+	+	+	d
Outras características conhecidas	Produz enterotoxinas	Produz cristais de endotoxinas	Crescimento rizoide	Patogênico para homens e animais

'+' = >90% estirpes positivas; '+/-' = 50% estirpes positivas; '-' = >90% estirpes negativas; 'd' = maioria das estirpes negativas.

Fonte: RHODEHAMEL e HARMON, 1998.

As células de *B. cereus* são grandes, com cerca de 1,0 a 1,2 µm de largura e 3,0 a 5,0 µm de comprimento e apresentam motilidade associada a flagelos peritríqueos (KRAMER e GILBERT, 1989; RAJKOWSKI e BENNET, 2003). *B. cereus* é considerado um micro-organismo termodúrico, uma vez que seus esporos são termorresistentes podendo sobreviver aos processamentos térmicos utilizados na indústria de alimentos (BRADSHAW et al., 1975; GAILLARD et al., 1998; CRONIN e WILKINSON, 2008; AIRES et al., 2009). Os endósporos de *B. cereus* são resistentes a condições ambientais extremas, tais como tratamento térmico e desidratação.

Quando a condição é favorável, os esporos podem germinar e se multiplicar nos alimentos processados (ABEE et al., 2011).

A termorresistência dos esporos de *B. cereus* pode variar de acordo com a estirpe (MAZAS et al., 1999; CRONIN e WILKINSON, 2008; AIRES et al., 2009). Bradshaw et al. (1975), ao avaliarem duas estirpes de esporos de *B. cereus*, constataram uma estirpe termorresistente, com um valor D_{121} de 2,35 min. Dufrenne et al. (1995) identificaram várias estirpes de *B. cereus* psicotróficas e formadoras de esporos com valor D_{90} entre 2,8 a 9,2 min e, uma delas, com valor D_{90} superior a 100 min.

B. cereus tem sido isolado em uma grande variedade de alimentos processados e *in natura*, entre eles, arroz e massas, fórmulas infantis, vegetais, pimentas, alimentos prontos para consumo, leite fluido e derivados lácteos (SENESI e GHELARDI, 2010; CHAVES et al., 2011). *B. cereus* e *B. licheniformis* são as espécies de bacilos predominantes encontradas em leite cru e em todas as etapas do processamento dos produtos lácteos (BANYKÓ e VYLETELOVÁ, 2009).

O tratamento térmico aplicado ao leite estimula a germinação dos esporos de *B. cereus* que, na ausência da microbiota competitiva, encontram condições favoráveis para multiplicar-se no produto (WATANUKI e GALLO, 2008). Os esporos de *B. cereus* germinam após o tratamento térmico do leite, uma vez que a temperatura ótima de ativação é de 65 a 75 °C, ou seja, faixa de temperatura utilizada na pasteurização do leite (MEER et al., 1991). Algumas estirpes de *B. cereus* podem se multiplicar em temperaturas de refrigeração (DUFRENNE et al., 1995; GARCÍA-ARMESTO e SUTHERLAND, 1997; LARSEN e JORGENSEN, 1999; GUINEBRETIERE et al., 2008; ZHOU et al., 2010).

A combinação das características termodúrica e psicotrófica em uma espécie microbiana denota o seu grande potencial deteriorante, considerando que este micro-organismo pode resistir aos principais tratamentos utilizados na indústria de alimentos e produzir lipases e proteases que irão afetar a qualidade do leite e derivados (MEER et al., 1991; MATTA e PUNJ, 1999).

2.2.1. Patogenicidade

B. cereus são capazes de produzir uma ampla variedade de substâncias potencialmente patogênicas, podendo-se citar: hemolisinas, fosfolipases, enterotoxinas, metaloproteases, colagenases e beta-lactamases, entre outras (MARTÍNEZ-BLANCH et al., 2009).

B. cereus é responsável por dois tipos de doenças de origem alimentar: uma infecção chamada de síndrome diarreica, provocada por enterotoxinas produzida *in vivo*, ou seja, produzida no intestino do hospedeiro; e a síndrome emética, uma intoxicação atribuída a uma toxina pré-formada no alimento (DROBNIEWSKI, 1993; AGATA et al., 1995; WIJNANDS et al., 2002; ARNESEN et al., 2008; SENESI e GHELARDI, 2010). A síndrome emética é caracterizada por ocorrência de náuseas e vômito, geralmente 2h após do consumo do alimento contaminado (KRAMER e GILBERT, 1989). Os sintomas da síndrome diarreica são manifestados após 12h do consumo do alimento contaminado, os quais incluem náuseas, mal-estar e diarreia (Tabela 2).

Tabela 2 – Doenças transmitidas por alimentos causadas por *Bacillus cereus*.

Características	Síndrome Diarreica	Síndrome Emética
Dose infecciosa	$10^5 - 10^7$ UFC	$10^5 - 10^8$ UFC/g para produzir a toxina no alimento
Local de produção da toxina	No intestino delgado do hospedeiro	Pré-formada no alimento
Tipo de toxina	Proteína (HBL, NHE e CytK)	Peptídeo cíclico
Período de incubação	8-16h (até vários dias)	0,5-5h
Duração da doença	12-24h (até vários dias)	6-24h
Sintomas	Dor abdominal, diarreia aquosa (ou sanguinolenta) e náuseas	Náusea, vômito e enjoo (pode ser seguidos de diarreia)
Alimentos mais frequentemente contaminados	Produtos à base de carnes, sopas, vegetais, pudins e molhos, leite e produtos lácteos	Arroz requeitado, macarrão e alimentos prontos

Fonte: GRANUM, 2002.

A dose infectante é relativamente alta para as duas síndromes. No caso da diarreica, a dose é de 10^5 a 10^8 células ou esporos e no caso da síndrome emética o número de células necessárias para produzir a toxina emética ainda não está bem estabelecido (ARNESEN et al., 2008). No entanto, alguns autores afirmam que concentrações acima de 10^3 UFC em 1 g ou 1 mL de alimento são consideradas inseguras para consumo (CHOMA e GRANUM, 2002; MARTÍNEZ-BLANCH et al., 2009). Ambas as síndromes apresentam duração dos sinais clínicos por cerca de 24h (KRAMER e GILBERT, 1989).

A toxina emética, também denominada de cerulida, é um dodecadepéptido, resistente ao calor e a variações de pH (LUND e GRANUM, 1997). *B. cereus* produz concentrações de toxina emética significativamente maiores entre 12 °C e 15 °C do que observado a 30 °C, sendo que a 37 °C não houve a produção de toxina (FINLAY et al., 2000).

A cerulida é estável ao calor, acidez e proteólise. Devido a estas características, a toxina não é inativada pelo suco gástrico nem pelas enzimas proteolíticas do trato intestinal e permanece viável nos alimentos reaquecidos (ARNESEN et al., 2008). Por causa desta alta estabilidade térmica e química, não existe maneira de descontaminar alimentos ou matérias-primas que contenham a cerulida (ANDERSSON et al., 2004).

Apesar de *B. cereus* ser um micro-organismo amplamente encontrado na natureza, são raras as estirpes produtoras de toxina emética (ALTAYAR e SUTHERLAND, 2006). Além disso, existe uma grande diversidade entre as estirpes de *B. cereus* quanto à presença de genes enterotoxigênicos e habilidade de produzir toxinas eméticas (WIJNANDS et al., 2006).

Foram identificados quatro tipos de enterotoxinas: 1) toxina hemolítica BL (HBL), uma enterotoxina hemolítica complexa, formada por três proteínas; 2) enterotoxina não-hemolítica (NHE), também composta por três proteínas; 3) enterotoxina T, uma proteína simples; e 4) citotoxina K (CytK), outra proteína simples. Há relatos de

surtos de origem alimentar associados a todas estas toxinas, exceto a enterotoxina T (WIJNANDS et al., 2002; ARNESEN et al., 2008).

A identificação das estirpes patogênicas pode ser feita a partir de métodos moleculares, por meio da detecção dos genes que codificam as proteínas que compõem suas respectivas toxinas (ARAGON-ALEGRO et al. 2008; CHAVES et al., 2011). Outros métodos, como os imunológicos, também são utilizados para a avaliação de estirpes patogênicas. Entre estes, o kit BCET-RPLA (Oxoid) é considerado um método simples e confiável para a detecção da produção de enterotoxina HBL (GRANUM et al., 1993).

Em um levantamento feito na região Sul do Brasil com 97 estirpes isoladas em alimentos durante três décadas, o complexo NHE foi positivo em 85,5% das estirpes para os três genes *nheA*, *nheB* e *nheC*. O complexo HBL (*hblA*, *hblC* e *hblD*) foi encontrado em 62,9% das estirpes e o gene *cytK* foi encontrado em 45,4% das estirpes. Estirpes isoladas do mesmo grupo de alimentos apresentam perfis toxigênicos distintos (CHAVES et al., 2011).

Doenças associadas a *B. cereus* são subestimadas devido a curta duração e sintomas brandos na maioria dos casos, o que desestimula o paciente a procurar cuidados médicos. Adicionalmente, os casos e surtos nem sempre são associados com *B. cereus*. Os sintomas da síndrome emética são semelhantes aos da intoxicação causada por *S. aureus* e a síndrome diarreica apresenta os mesmos sintomas que os causados por *C. perfringens* tipo A e acabam sendo tratados como se fossem dessas origens (ARNESEN et al., 2008).

2.2.2. Ocorrência em produtos lácteos

A presença de *B. cereus* já foi relatada em leite *in natura*, pasteurizado, UHT, leite em pó, leites fermentados, sorvetes e outros derivados lácteos em diversos países (WONG et al., 1988; LARSEN e JORGENSEN, 1997; CHRISTIANSSON et al., 1999; VIDAL-MARTINS et al., 2005; REYES et al., 2007; REZENDE-LAGO et al.,

2007; BARTOSZEWICZ et al., 2008; ZHOU et al., 2008). Isso se deve à contaminação da matéria-prima e sobrevivência dos esporos ao processamento térmico, bem como à contaminação pós-processamento (SCHRAFT et al., 1996; GIFFEL et al., 1997; CHRISTIANSSON et al., 1999; SVENSSON et al., 1999; REZENDE-LAGO et al., 2007).

Wong et al. (1988) ao avaliarem 293 amostras de produtos lácteos adquiridos no comércio na China, detectaram a presença de *B. cereus* em amostras de leite em pó (29%), leite fermentado (17%), picolé (52%), sorvete (2%), leite pasteurizado (2%) e leite pasteurizado aromatizado (2%). Zhou et al. (2010) detectaram a presença de *B. cereus* em 24 das 40 amostras de sorvete (60%) também coletadas na China. Em 32% das amostras de leite pasteurizado comercializadas em Nova Iorque, EUA, foi detectada a presença de *Bacillus* spp., 9% destas identificadas como *B. cereus* (FROMM e BOOR, 2004).

A contaminação de produtos lácteos com *B. cereus* é também relatada em trabalhos de pesquisa realizadas no Brasil. Vidal-Martins et al. (2005) constataram a presença dessa bactéria em 11,8% de amostras de leite UHT comercializadas em São José do Rio Preto-SP. Este resultado pode indicar uma alta contagem de esporos no leite cru, tratamento térmico (tempo/temperatura) insuficiente para a inativação dos esporos ou contaminação pós-processamento. Rezende-Lago et al. (2007) identificaram *B. cereus* em 58,3% de 120 amostras de leite em pó, cru, pasteurizado e longa vida em Ribeirão Preto-SP. Os autores identificaram maior ocorrência de *B. cereus* no leite pasteurizado do que no leite cru, e relacionaram este resultado à contaminação do leite após o tratamento térmico. Algumas estirpes eram produtoras de enterotoxinas, o que indicou o risco potencial à saúde do consumidor ao ingerir produtos contaminados com esse patógeno.

Os esporos de *B. cereus* podem sobreviver, germinar e se multiplicar durante as etapas de processamento do queijo; no entanto, sua presença é inibida após a salga e durante a maturação, devido ao conteúdo de sal, redução da atividade de água,

baixo potencial de óxido-redução e pH do queijo Gouda maturado (RUKURE e BESTER, 2001).

Embora a ocorrência de *B. cereus* em leite e derivados seja alta, as intoxicações causadas por este micro-organismo associado ao consumo de produtos lácteos são raras, com a ocorrência de casos limitados às residências, em geral não notificados (CORNELL, 2010). Possivelmente, se houvesse um sistema de notificação apropriado, o leite e seus derivados seriam produtos relevantes considerando a alta exposição do consumidor a este patógeno por meio do consumo de leite e derivados (NOTERMANS et al., 1997).

Não existe uma legislação brasileira específica para a presença de *B. cereus* no leite e nos derivados lácteos, com exceção do leite em pó, em que é estabelecido um limite de $5,0 \times 10^3$ UFC/g (BRASIL, 2001).

2.2.3. Fontes de contaminação

As principais fontes de contaminação do leite por esporos de *B. cereus* são o contato direto ou indireto com solo e poeira durante a ordenha, tetos sujos, alimento (silagem) e fezes (CHRISTIANSSON et al., 1999; VISSERS et al., 2007). A água residual da lavagem dos equipamentos de ordenha e o material da cama de animais confinados também são importantes fontes de contaminação (MAGNUSSON et al., 2007).

B. cereus apresenta capacidade de adesão e de formação de biofilmes em superfícies de equipamentos utilizados em laticínios, sendo dificilmente removido pelos procedimentos de higienização rotineiros (SALUSTIANO et al., 2009). A adesão de esporos em superfícies de tanques de refrigeração dificulta sua remoção pelos procedimentos de higienização, mesmo com uso de água quente e detergente alcalino (SHAHEEN et al., 2010). A capacidade de formação de biofilmes é observada mesmo em temperaturas de refrigeração (BERNARDES, 2008).

Os esporos de *B. cereus* podem se aderir, germinar e multiplicar na superfície dos trocadores de calor. Giffel et al. (1997) comprovaram que as mesmas estirpes detectadas na superfície dos trocadores de calor foram também detectadas no leite, o que permitiu atribuir aos equipamentos uma contaminação pós-processamento.

A contaminação do leite cru por esporos tem sido relatada como a principal causa de presença de *B. cereus* em leite processado (VAISANEN et al., 1991; LIN et al., 1998; SVENSSON et al., 1999). Semelhança genética entre estirpes de *B. cereus* detectadas no leite cru e no leite pasteurizado permitiram comprovar a resistência dessa bactéria aos processamentos térmicos por apresentarem a mesma origem genética (CHRISTIANSSON et al., 1999; SVENSSON et al., 1999).

Em contrapartida, a presença de *B. cereus* em leite processado também pode ser associada à ocorrência de contaminação pós-processamento (REZENDE-LAGO et al., 2007), que é considerada um fator crítico na indústria de produtos lácteos (SCHRAFT et al., 1996).

Estudos realizados na Europa indicam que a ocorrência de *B. cereus* no leite é maior no verão e na primavera. Esta sazonalidade do micro-organismo pode ser atribuída às condições de manejo do rebanho, já que nas estações mais quentes os animais ficam livres no pasto, onde têm maior contato com o ambiente e, conseqüentemente, mais expostos à contaminação (SVENSSON et al., 2004; VISSERS et al., 2007; BARTOSZEWICZ et al., 2008).

2.2.4. Estirpes psicotróficas

A presença de *B. cereus* em produtos lácteos tem causado graves problemas para a indústria de laticínios, principalmente as estirpes psicotróficas, as quais encontram nos produtos processados condições ideais para a sua multiplicação, pela quase ausência de microbiota competidora.

Diferentes estirpes de *Bacillus* spp. podem apresentar comportamentos distintos em diferentes temperaturas. García-Armesto e Sutherland (1997) classificaram essas estirpes em três grupos fisiológicos: um deles claramente psicotrófico, capaz

de se multiplicar a 6,5 °C em 10 dias, mas não a 40 °C em dois dias; psicrotrófico intermediário, capaz de se multiplicar a 40 °C e a 6,5 °C, e outro grupo mesófilo, capaz de se multiplicar a 30 °C e a 40 °C, mas não a 6,5 °C. As estirpes avaliadas pelos autores apresentaram comportamento predominantemente intermediário.

Lechner et al. (1998) classificaram as estirpes psicrotróficas do grupo *B. cereus* (capazes de se multiplicar entre 4 e 7 °C, mas que não se multiplicam a 43 °C) como sendo *B. weihenstephanensis*. No entanto, estudos posteriores confirmaram que as estirpes psicrotróficas do grupo *B. cereus* não são, necessariamente, *B. weihenstephanensis* (STENFORS e GRANUM, 2001; ZHOU et al., 2010).

A ocorrência de *B. cereus* psicrotrófico tem relação com as condições climáticas das regiões de onde o mesmo é isolado. Em regiões frias, sua ocorrência é maior do que nas regiões tropicais, onde *B. cereus* mesófilo representa a maioria das estirpes isoladas (STETTEN et al., 1999; CARLIN et al., 2010).

Algumas características podem explicar a capacidade de determinadas estirpes de *B. cereus* se desenvolver em baixas temperaturas, por exemplo, a composição dos ácidos graxos da membrana celular. Estirpes psicrotróficas de *B. cereus* têm maiores concentrações de ácidos graxos insaturados na membrana lipídica, comparadas às concentrações observadas em micro-organismos mesófilos (COUSIN, 1982; CARLIN et al., 2010). Os ácidos graxos insaturados proporcionam maior fluidez da membrana em baixas temperaturas aumentando a permeabilidade da célula. Portanto, pode-se dizer que a temperatura mínima de multiplicação de *B. cereus* tem relação direta com a composição de ácidos graxos da sua membrana celular (VAISANEN et al., 1991).

Foegeding e Berry (1997) induziram *B. cereus* a se adaptar ao frio repicando e incubando as estirpes a 7 °C por 8 semanas e verificaram um aumento significativo na ocorrência de estirpes positivas nesta temperatura após este período de adaptação.

A adaptação de *B. cereus* ao frio envolve mecanismos físicos e químicos, entre eles, a síntese de proteínas do choque-frio codificadas pelo gene *cspA*. Este gene

contribui para a existência de ribossomos capazes de codificar o mRNA em proteínas, mesmo em baixas temperaturas (CARLIN et al., 2010). O gene *cspA* confere a capacidade de *B. cereus* sobreviver e se multiplicar a baixas temperaturas (MAYR et al., 1996; FRANCIS et al., 1998).

A presença do gene *cspA* está diretamente relacionada com a temperatura média anual da região onde as estirpes são isoladas. Em regiões alpinas (com temperatura média de 1 a 7 °C), o gene *cspA* está presente na maioria das estirpes de *B. cereus*, enquanto que em regiões tropicais (com temperatura média de 28 °C), as estirpes são predominantemente mesófilas, ou seja, não apresentam o gene *cspA* (STETTEN et al., 1999).

Estirpes psicotróficas de *B. cereus* apresentam maior capacidade de germinação e multiplicação em produtos lácteos com alto teor de gordura, devido à hidrofobicidade dos seus esporos (LARSEN e JORGENSEN, 1997). Além disso, os lipídeos conferem um caráter protetor aos esporos, uma vez que a gordura apresenta baixa condutividade térmica (MEER et al., 1991).

Células vegetativas de estirpes psicotróficas de *B. cereus* apresentam fase de adaptação inferior a dois dias e tempo de geração entre 9,4 e 75,2h em leite refrigerado a 7 °C (DUFRENNE et al., 1995). Quando o leite é mantido a 10 °C, a fase de adaptação passa a ser de 24h e o tempo de geração passa a ser de 4h (MEER et al., 1991). *B. cereus* apresenta maior capacidade de multiplicação a 10 °C do que a 7 °C (FOEGEDING e BERRY, 1997; GIFFEL et al. 1997).

Esporos de *B. cereus* mesófilos são mais termorresistentes que os esporos de *B. cereus* psicotrófico. No entanto, os esporos psicotróficos também podem sobreviver à pasteurização (GIFFEL et al., 1997; SVENSSON et al., 2004; PLANCHON et al., 2011). A germinação de esporos de *B. cereus* psicotróficos ocorre a 7 °C, o que pode ser considerado um problema para produtos lácteos (DUFRENNE et al., 1995; LARSEN e JORGENSEN, 1999).

Vaisanen et al. (1991) encontraram estirpes de *B. cereus* isoladas em produtos lácteos com temperatura mínima de multiplicação abaixo de 10 °C e alertaram para

o problema que estas estirpes psicrotróficas representam para produtos armazenados em refrigeração. Giffel et al. (1997) verificaram que 53% das estirpes de *B. cereus* se multiplicaram a 7 °C.

Meer et al. (1991) relataram que 25% das estirpes de *B. cereus* isoladas em leite pasteurizado são psicrotróficas e produzem enterotoxinas. Granum et al. (1993) avaliaram 85 estirpes de *B. cereus* isoladas em produtos lácteos na Noruega, das quais 59% eram enterotoxigênicas, sendo 15% destas psicrotróficas.

No entanto, Carlin et al. (2010) afirmam que estirpes psicrotróficas de *B. cereus* isoladas em produtos lácteos produzem quantidades muito menores de enterotoxina HBL e NHE quando comparadas às estirpes mesófilas, apresentando menor potencial patogênico.

B. cereus pode se multiplicar durante o período de estocagem do leite pasteurizado e a sua contagem no produto pode aumentar significativamente (LARSEN e JORGENSEN, 1999), durante o prazo de validade.

2.2.5. Relação com problemas tecnológicos em produtos lácteos

As alterações associadas às contaminações de produtos lácteos com *B. cereus* são consideradas importantes sob o ponto de vista tecnológico, uma vez que provocam uma redução do prazo de validade e o desenvolvimento de atributos sensoriais indesejáveis (ALMEIDA et al., 2000; CHEN et al., 2004; FROOM e BOOR, 2004; REZENDE-LAGO et al., 2007; DE JONGHE et al., 2010). Espécies do gênero *Bacillus* sintetizam várias enzimas, como proteases, lipases e fosfolipases, que podem ser intra ou extracelulares (CHEN et al., 2004).

Meer et al. (1991) estimaram que 20% a 25% dos problemas de prazo de validade dos produtos lácteos comercializados nos Estados Unidos foram relacionados com a presença de enzimas produzidas por *B. cereus* e *B. mycoides* psicrotróficos. Existe uma carência na literatura de dados mais atualizados referentes às perdas econômicas causadas por *B. cereus* em produtos lácteos.

Atividade lipolítica

A atividade lipolítica de *Bacillus* é maior em ésteres de cadeia curta, como o butirato, caproato, caprilato e caprato. Monoacilgliceróis e diacilgliceróis são hidrolisados mais rapidamente que os triacilgliceróis. As lipases produzidas apresentam alta estabilidade térmica, sendo mais resistentes que as proteases. Esta estabilidade está associada à substituição da glicina por um resíduo de alanina no sítio ativo do pentapeptídeo Gly-X-Ser-X-Gly (CHEN et al., 2004).

A presença de lipases em queijos pode causar a hidrólise da gordura, com liberação de ácidos graxos e formação de ácido butírico, o qual confere sabor saponificado ao produto. O defeito é percebido ao longo da maturação e é comum em queijos de maturação prolongada, como Emmental, Gruyère, Parmesão e também no queijo Prato, de maturação mais longa (FURTADO, 2005). Em leite UHT, a ação de lipases também gera alterações sensoriais, como gosto amargo e sabores rançoso, butírico e de sabão durante a estocagem (ANDERSON et al., 1981).

A presença de lipases no leite cru pode afetar a qualidade do leite em pó (CHEN et al., 2003). O teor de ácidos graxos livres em leite em pó fabricado com leite cru armazenado por quatro dias é significativamente maior do que no leite em pó fabricado com leite recém-ordenhado, não havendo diminuição da atividade lipolítica durante o processamento do leite em pó (CELESTINO et al., 1997).

O teor de ácidos graxos livres (AGL) aumenta significativamente (0,08 a 0,50 mEq AGL/kg de gordura) em leite pasteurizado contaminado com *B. cereus*, armazenado em refrigeração, por 14 dias. Análise sensorial indicou o sabor de ranço nas amostras, considerado um defeito causado pela presença de ácidos graxos livres formados durante a lipólise (FROOM e BOOR, 2004).

B. cereus também produz fosfolipase, que atua sobre a membrana fosfolipídica do glóbulo de gordura do leite, causando um defeito conhecido como “bitty cream” (DE JONGHE et al., 2010). A coalescência dos glóbulos de gordura devido ao rompimento da membrana fosfolipídica causa a formação de flocos aglomerados de gordura na superfície do leite (CHRISTIANSSON, 2002).

Atividade proteolítica

As proteases liberadas pelas bactérias psicrotróficas no leite são, em sua maioria, metalo-proteases, com a presença de Ca e Zn. Grande parte apresenta baixo peso molecular, com resíduos de glicina e alanina, concentrações mínima de metionina, ausência de cistina e presença da alanina no grupo terminal N. A ausência de pontes dissulfeto entre as cadeias de aminoácidos, por promover uma maior flexibilidade na estrutura primária da enzima, confere grande estabilidade térmica a estas enzimas (MITCHELL e EWINGS, 1986).

A presença de Ca^{2+} e de Zn^{2+} na estrutura das proteases também contribui na estabilidade destas enzimas ao calor, com resistência à temperatura de 149 °C/7 seg, similar ao tratamento UHT (BARACH et al., 1976).

B. cereus apresenta atividade proteolítica mais acentuada sobre as caseínas, comparada à atividade sobre as proteínas do soro (CHOUDHERY e MIKOLAJCIK, 1970; JANSTOVÁ et al., 2006; MURUGAN e VILLI, 2009). A degradação da caseína do leite pela ação da protease produzida por *B. cereus* libera peptídeos de baixo peso molecular que podem causar a formação de sabores indesejáveis no leite (JANSTOVÁ et al., 2006). Esta proteólise provoca uma redução de 4,15% no teor de nitrogênio da caseína com relação à proteína total do leite (MURUGAN e VILLI, 2009). A ação proteolítica de *B. cereus* pode causar a formação de gosto amargo e coagulação doce após seis dias do processamento dos produtos lácteos (MEER et al., 1991).

A proteólise do leite UHT durante a estocagem em temperatura ambiente é o principal limitante de seu prazo de validade, associada a alterações na sua textura, como aumento da viscosidade, o que ocasiona, em alguns casos, a formação de gel (VIDAL-MARTINS et al., 2005). A concentração de caseínas e o pH do leite apresentam condições ótimas para a atividade das proteases. As proteases apresentam atividade à temperatura ambiente (25 °C) e o leite UHT pode permanecer estocado por longos períodos nesta temperatura (ADAMS et al., 1975).

Proteases degradam as micelas de caseína, com liberação de componentes solúveis, como polipeptídios e aminoácidos, os quais são perdidos no soro e, assim, acarreta na redução do rendimento de queijos (CARDOSO, 2006). A formação de gosto amargo por proteases ocorre mais acentuadamente em queijos maturados, uma vez que atuam durante todo o período de maturação, representando um grande problema de qualidade nestes produtos (FURTADO, 2005). Em leite em pó, a ação das proteases, além de provocar a formação de gosto amargo, pode reduzir a solubilidade do produto em água (CELESTINO et al., 1997; CHEN et al., 2003).

2.2.6. Identificação genotípica de *B. cereus* psicrotrófico

As técnicas tradicionais de microbiologia de alimentos fundamentam-se na utilização de testes morfológicos e bioquímicos para tipagem, subtipagem e identificação de gêneros, espécies e subespécies microbianas. No entanto, estes resultados podem apresentar variabilidade pela ação de fatores ambientais sobre a expressão gênica, além de outras desvantagens, como o baixo poder discriminatório em micro-organismos com pouca variabilidade genética, além do risco de interpretações errôneas quando se utiliza um número limitado de testes (SETTANNI e CORSETTI, 2007; GANDRA et al., 2008).

Diversos métodos para a amplificação *in vitro* de ácidos nucleicos têm sido desenvolvidos. Entre eles, a reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido utilizada para a identificação de estirpes bacterianas isoladas, para detectar bactérias em alimentos, em combinação com as etapas de enriquecimento de culturas e para a detecção direta de bactérias e vírus em amostras de alimentos (CANDRIAN, 1995).

A PCR apresenta vantagens em relação aos métodos convencionais, tais como: maior poder de tipificação e discriminação, maior rapidez, bom limite de detecção, maior seletividade, especificidade, potencial para automação e a possibilidade de trabalhar com bactérias que não são cultiváveis nos meios de cultura convencionais

(GANDRA et al., 2008). No entanto, apresenta algumas desvantagens, entre elas, não diferenciar células vivas e mortas, sofrer interferência com a presença de inibidores da enzima polimerase em alguns alimentos, apresentar alto investimento em equipamentos e reagentes e a falta de aprovação, padronização e regulamentação por parte dos órgãos oficiais (MALORNY et al., 2003).

Uma das etapas decisivas dos métodos moleculares é o isolamento do DNA bacteriano em quantidade e qualidade suficientes para amplificação pela PCR (CANDRIAN, 1995; POSTOLLEC et al., 2011). Outros fatores podem influenciar a eficiência da PCR, sendo os principais a concentração de íons de magnésio, a temperatura, a duração e o número de cada ciclo da reação, concentração dos dNTPs, *primers* e da polimerase (GANDRA et al., 2008).

Para que a amplificação ocorra, o DNA é inicialmente aquecido e desnaturado a uma temperatura que varia de 94 a 96 °C. Os oligonucleotídeos iniciadores são posteriormente alinhados nas sequências-alvo em temperaturas que variam de 30 a 60 °C de acordo com o oligonucleotídeo. Então a enzima DNA polimerase, a partir dos desoxirribonucleotídeos trifosfato (dNTPs) adicionados ao sistema, permite a síntese do fragmento de DNA desejado. A repetição destas etapas por 20 a 30 ciclos permite a amplificação de um fragmento de DNA milhares de vezes (ERLICH et al., 1991).

Outra técnica molecular de interesse para o diagnóstico de patógenos em alimentos é a multiplex PCR (mPCR). A mPCR amplifica simultaneamente diferentes sequências de DNA, a partir de múltiplos pares de *primers* com diferentes especificidades. A separação por eletroforese de fragmentos com diferentes pesos moleculares origina diversas bandas que são visualizadas em gel de agarose (SETTANNI e CORSETTI, 2007). A mPCR é uma técnica vantajosa, pois reduz o trabalho laboral e diminui os gastos com reagentes, uma vez que na mesma reação pode identificar diferentes patógenos ou sequências de interesse (GANDRA et al., 2008). No entanto, as condições da reação de mPCR precisam ser ajustadas para

que não haja pareamento entre os *primers*, gerando assim reações inespecíficas (SETTANNI e CORSETTI, 2007).

A identificação do gene *cspA* tem sido utilizada por diversos autores para identificar estirpes psicotróficas de *B. cereus* (STETTEN et al., 1998; BORGE et al., 2001; STENFORS e GRANUM, 2001; WIJNANDS et al., 2002; SVENSSON et al., 2007; ZHOU et al., 2010). Esta metodologia foi desenvolvida por Francis et al. (1998) a partir da identificação da proteína do choque do frio, para a diferenciação de estirpes de *B. cereus* psicotróficas e mesófilas. Posteriormente a mesma metodologia foi publicada por Wijnands et al. (2002) em um manual do Departamento de Veterinária e Saúde Pública de Bilthoven, Países Baixos. Esta metodologia vem sendo utilizada desde então para a caracterização genotípica de estirpes de *B. cereus* psicotróficas.

Outro método molecular que proporciona a diferenciação rápida de estirpes mesófilas e psicotróficas de *B. cereus* se baseia na amplificação de regiões de 16S rDNA. Isto é possível por que a região 16S rDNA apresenta assinaturas específicas para comportamentos psicotrófico e mesófilo. *Primers* específicos para cada região geram fragmentos de diferentes tamanhos (sequência psicotrófica: 130 pb; sequência mesófila: 250 pb), proporcionando a diferenciação destas estirpes em uma PCR *duplex*. No entanto, a região 16S rDNA também é muito conservada em bactérias que não pertencem ao grupo *B. cereus*, sendo esta técnica indicada somente para estirpes confirmadas bioquimicamente como sendo *B. cereus* (STETTEN et al., 1998; ZHOU et al., 2010).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado nos laboratórios de Microbiologia de Alimentos do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal do Paraná, em Curitiba, Paraná, de Bioengenharia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, em Ponta Grossa, Paraná, e de Controle Microbiológico de Água e Alimentos, da UFPR, em Palotina, Paraná.

Para atendimento dos objetivos do presente trabalho, um plano analítico em distintas fases de avaliações experimentais foi desenvolvido.

Inicialmente, a presença de *B. cereus* em produtos lácteos foi avaliada por técnicas de semeadura direta e enriquecimento seletivo, e identificado por provas bioquímicas específicas para esta espécie. Em seguida, as estirpes isoladas foram avaliadas quanto ao seu comportamento psicrotrófico, capacidade proteolítica e lipolítica em meios de cultura específicos para estas características em diferentes temperaturas. Posteriormente, foi avaliada a temperatura ótima de produção de proteases pelas estirpes de *B. cereus* isoladas.

Estirpes capazes de se multiplicar a 10 °C foram avaliadas com relação ao seu potencial enterotoxigênico, utilizando um kit específico para a identificação enterotoxina HBL. Por fim, foi procedida a identificação das estirpes isoladas que possuíam genes que caracterizam o comportamento psicrotrófico por PCR.

A seguir, estão descritas as metodologias utilizadas para execução de cada uma das avaliações acima mencionadas.

3.1. Estudo sobre a ocorrência de *B. cereus* em produtos lácteos

3.1.1. Coleta de amostras

Na primeira fase do experimento, foram avaliadas 85 amostras de diferentes produtos lácteos refrigerados de marcas comerciais brasileiras, dentro do prazo de validade, adquiridas no comércio varejista de Curitiba-PR, no período de abril a junho de 2009. Foram coletadas 22 amostras de requeijão, 17 de leite pasteurizado,

17 de creme de leite pasteurizado, 12 de manteiga, oito de ricota, cinco de queijo fresco e quatro de produtos lácteos diversos (duas sobremesas lácteas, uma bebida láctea e um iogurte). As amostras foram mantidas a 4 °C até o momento da análise.

Na segunda etapa deste experimento, foram analisadas amostras de leite pasteurizado, leite UHT e leite em pó. Entre março e dezembro de 2010, foram avaliadas 110 amostras de 19 marcas diferentes de leite UHT, 100 amostras de 18 marcas de leite pasteurizado e 50 amostras de 16 marcas de leite em pó, coletadas no comércio do Paraná (Curitiba e Palotina), Santa Catarina (Chapecó e Florianópolis) e São Paulo (São Paulo e Botucatu), totalizando 260 amostras disponíveis no mercado nacional, dentro do prazo de validade.

As amostras de leite pasteurizado foram mantidas a 4 °C até o momento das análises. As amostras de leite em pó foram mantidas em temperatura ambiente e as amostras de leite UHT foram incubadas a 35 °C por 7 dias antes da execução das análises, conforme recomendação da Portaria 146 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil (BRASIL, 1996).

3.1.2. Análises microbiológicas

As amostras da primeira etapa do experimento foram submetidas à análise qualitativa de *B. cereus* (com enriquecimento seletivo). Na segunda etapa foram utilizadas duas metodologias, sendo uma quantitativa (semeadura direta), seguindo o protocolo analítico desenvolvido por Mossel et al. (1967), e outra qualitativa (enriquecimento seletivo), de acordo com Stadhouders (1992).

A avaliação quantitativa de *B. cereus* foi realizada por semeadura de 0,1 mL de amostras em diluições seriadas (10^0 , 10^{-1} e 10^{-2}) no ágar seletivo manitol-gema de ovo-polimixina B (MYP) (Difco). Após incubação a 30 °C por 18-40h, uma a três colônias por amostra características de *B. cereus* (coloração rósea, grandes, secas e cerosas, rodeadas por um grande halo de precipitação) foram submetidas à identificação bioquímica (MOSSEL et al., 1967; BENNET e BELAY, 2001).

Para a avaliação qualitativa de *B. cereus*, foi realizado o enriquecimento seletivo de 25 mL ou g de amostra em 225 mL de caldo de soja triptona (TSB) (Himedia) adicionado de 0,1% de polimixina B, seguido de incubação a 30 °C por 24-30h (STADHOUDERS, 1992). A semeadura seletiva foi feita por estrias descontínuas em ágar MYP (Difco), com incubação a 30 °C por 18-40h, de modo a obter colônias isoladas. As colônias características de *B. cereus* foram submetidas à identificação bioquímica (BENNET e BELAY, 2001).

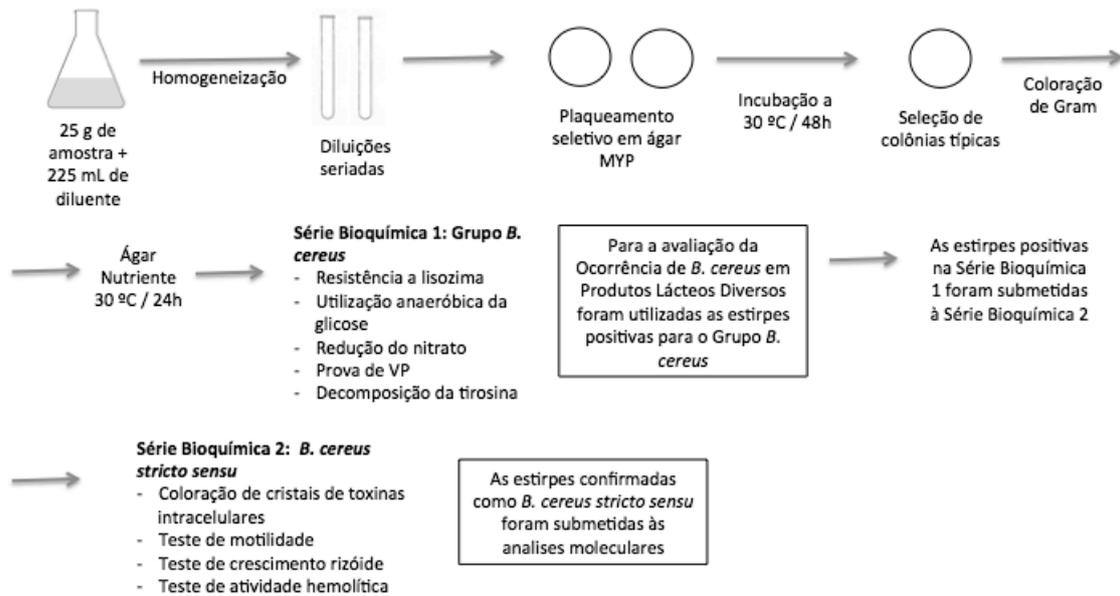
As colônias puras foram estocadas em ágar soja triptona (TSA) (Himedia) e mantidas em refrigeração. Para a realização das provas bioquímicas as culturas foram ressuspensas em TSB (Himedia) e incubadas a 30 °C/24h.

3.1.3. Identificação bioquímica de *B. cereus*

As colônias suspeitas foram submetidas aos seguintes testes bioquímicos para confirmação do grupo *B. cereus*: coloração de Gram, utilização anaeróbia da glicose, decomposição da tirosina, prova de Voges-Proskauer, redução do nitrato a nitrito e resistência a lisozima, conforme Bennet e Belay (2001), tomando-se como referência a combinação de resultados apresentados na Tabela 1.

As estirpes do grupo *B. cereus* isoladas de leite pasteurizado, leite em pó e leite UHT foram submetidas a uma nova série de provas bioquímicas (Figura 1), a fim de diferenciar *B. cereus sensu stricto* dos demais bacilos do grupo. Os testes aplicados foram de verificação da produção de cristais de toxinas intracelulares, a verificação da motilidade, do crescimento rizoide e da atividade hemolítica (RHODEHAMEL e HARMON, 1998; BENNET e BELAY, 2001; SILVA et al., 2010). As estirpes confirmadas como *B. cereus sensu stricto* foram submetidas às análises moleculares.

Para todas as provas bioquímicas foi utilizada em paralelo uma estirpe de *B. cereus* ATCC 11778 como controle positivo e uma prova contendo todos os reagentes menos a amostra como controle negativo.



Fonte: AUTOR.

Figura 1 – Fluxograma de análise para identificação bioquímica de *B. cereus*.

Utilização anaeróbia da glicose

As culturas foram inoculadas em 3 mL de caldo vermelho de fenol 1% glicose (Acumedia) e incubadas anaeróbiamente a 35 °C/24h. A mudança da cor do vermelho para o amarelo é indicativo da formação de ácido pela degradação da glicose (RHODEHAMEL e HARMON, 1998).

Decomposição da tirosina

As culturas foram estriadas na rampa de ágar tirosina inclinado (Laborclin) e incubadas a 35 °C/48h. A formação de uma região clara na região onde a cultura foi inoculada indica a decomposição da tirosina (RHODEHAMEL e HARMON, 1998).

Redução do nitrato

As culturas foram inoculadas em 5 mL de caldo nitrato (Himedia) e incubadas a 35 °C/24h. Após este período, adicionaram-se 0,25 mL de ácido sulfanílico 0,8% (Newprov) e 0,25 mL de α -naftol 0,5% (Newprov). A formação de cor rósea avermelhada após 10 min indica a redução do nitrato a nitrito (RHODEHAMEL e HARMON, 1998).

Prova de Voges-Proskauer

As culturas foram inoculadas em 3 mL de caldo VP (Himedia) e incubadas a 35 °C/48h. Após este período foram adicionados 1,8 mL de α -naftol e 0,6 mL de hidróxido de potássio 40%. A formação de coloração rosa ou violeta após 1h indica prova positiva (RHODEHAMEL e HARMON, 1998).

Resistência à lisozima

As culturas foram inoculadas em 2,5 mL de caldo lisozima 0,001% (Laborclin) e incubadas a 35 °C/48h. A turvação do meio indica a resistência à lisozima (RHODEHAMEL e HARMON, 1998).

Produção de cristais de toxinas intracelulares

As culturas estocadas em TSA (Himedia) foram mantidas 2-3 dias em temperatura ambiente. As lâminas foram preparadas a partir do esfregaço das culturas cobertas com metanol por 30 seg, flambadas e cobertas com fucsina básica 0,5%. Após 30 seg, as lâminas foram lavadas, secas e observadas ao microscópio óptico, em imersão. *B. thuringiensis* apresenta esporos livres e cristais tetragonais corados de vermelho (RHODEHAMEL e HARMON, 1998).

Crescimento rizoide

As culturas foram repicadas em ágar nutriente (Himedia) e incubadas a 30 °C/42-72h. A morfologia das colônias foi observada, sendo consideradas positivas as que apresentaram crescimento rizoide (RHODEHAMEL e HARMON, 1998).

Motilidade

As culturas foram repicadas por picada profunda em ágar motilidade semissólido (Laborclin) e incubadas a 30 °C/24h. A migração das células para fora da linha de inoculação indica a motilidade da cultura (RHODEHAMEL e HARMON, 1998).

Atividade hemolítica

As culturas foram repicadas em ágar sangue (Laborclin) e incubadas a 35 °C/24h. A formação de halo claro de hemólise ao redor das colônias é indicativo da atividade hemolítica (RHODEHAMEL e HARMON, 1998).

3.1.4. Análise dos resultados

A população em UFC/mL foi calculada em função do número de colônias típicas, diluição inoculada e percentagem de colônias confirmadas pelas provas bioquímicas.

Os dados de contagem de *B. cereus* foram transformados em Log e comparados pelo teste T de Student. As avaliações foram feitas com 95% de confiabilidade, utilizando-se o programa estatístico Statistica versão 8.0 (STATSOFT, 2009).

As frequências de positividade para a avaliação da presença de *B. cereus* nas amostras avaliadas foram comparadas por meio de teste diferenças entre proporções, com aplicação de Teste de Qui-Quadrado exato de Fisher (KAPS e LAMBERSON, 2009).

3.2. Identificação do comportamento psicrotrófico e atividade proteolítica e lipolítica

Após a identificação bioquímica, as estirpes confirmadas como sendo do grupo *B. cereus* foram avaliadas quanto seu comportamento psicrotrófico e atividade proteolítica e lipolítica em diferentes temperaturas (30 °C, 10 °C e 7 °C).

Foram avaliadas 101 estirpes, sendo 47 isoladas de leite pasteurizado, 25 de leite em pó, 18 de leite UHT, cinco de requeijão, quatro de manteiga, uma de creme de leite e uma de queijo frescal. As culturas estocadas em TSA foram ressuscitadas em TSB (Himedia) e incubadas a 30 °C/24h.

3.2.1. Avaliação do comportamento psicrotrófico

As culturas reativadas em TSB foram inoculadas em ágar MYP (Difco) e incubadas a 7 °C/10 dias e a 10 °C/7 dias, sendo consideradas positivas as estirpes que se multiplicaram nestas condições.

3.2.2. Avaliação da atividade proteolítica

Para avaliação da atividade proteolítica as estirpes foram semeadas em ágar leite. O ágar leite foi preparado com ágar padrão para contagem (Himedia) adicionado de 1% de leite em pó desnatado (BEERENS e LUQUET, 1990). As placas foram incubadas a 7 °C/10 dias, 10 °C/7 dias e 30 °C/48h. Foram consideradas positivas as colônias formadoras de halo transparente.

3.2.3. Avaliação da atividade lipolítica

Para avaliação da atividade lipolítica as estirpes foram semeadas em ágar tributirina. A ágar tributirina foi preparado com ágar padrão para contagem (Himedia) adicionado de 1% tributirina (Sigma) (BEERENS e LUQUET, 1990). As placas foram incubadas a 7 °C/10 dias, 10 °C/7 dias e 30 °C/48h. Foram consideradas positivas as colônias formadoras de halo transparente.

3.2.4. Análise dos resultados

As frequências de positividade para as avaliações da atividade enzimática entre os diferentes produtos, métodos analíticos e tempo/temperaturas de incubação foram comparadas por meio de teste diferenças entre proporções, com aplicação de Teste de Qui-Quadrado exato de Fisher (KAPS e LAMBERSON, 2009).

3.3. **Determinação da temperatura ótima de produção de proteases**

Foram selecionadas cinco estirpes de *B. cereus* (três isoladas de leite pasteurizado: LP46, LP4 e LP56, uma de leite em pó: LPO5 e uma de leite UHT:

UHT38), confirmadas pelas provas bioquímicas, morfológicas e que apresentaram atividade proteolítica na prova fenotípica para a determinação da temperatura ótima de produção de proteases.

A metodologia foi realizada de acordo com o descrito por Nörnberg et al. (2010): as culturas estocadas em TSA foram ressuspendidas em TSB (Himedia) e incubadas a 30 °C/24h. Após este período, foram inoculadas em 100 mL de meio mineral (0,5 g/L NaCl; 0,4 g/L K₂HPO₄; 0,3 g/L KH₂PO₄) contendo 10 g/L de caseína (Synth) e com o pH ajustado para 7,0. A produção da enzima foi avaliada em diferentes temperaturas (10 °C, 20 °C e 30 °C) em agitador orbital (OS-10, Uniscience) com de 120 rpm por 72h. Após esse período o meio foi centrifugado (centrífuga 6-15, Sigma) a 10.000 G por 5 min para separar a biomassa do sobrenadante. O sobrenadante foi utilizado para a análise da atividade proteolítica.

A atividade proteolítica foi determinada utilizando azocaseína (Sigma) como substrato. Para tanto, 100 µL do sobrenadante obtido das culturas foram adicionados a 100 µL de solução 0,1 g/mol de fosfato de sódio pH 7,0 e 100 µL de azocaseína (10 mg/mL) em microtubo plástico. A mistura foi incubada a 37 °C por 60 min e a reação foi interrompida pela adição de 500 µL de ácido tricloroacético 30% (Panreac). A solução foi centrifugada a 10.000 G e 800 µL do sobrenadante foram misturados com 200 µL de NaOH 1,8M. A absorbância foi medida em espectrofotômetro (Bel Photonics), com 2000 UV a 420nm. Em paralelo, foi preparado um branco, contendo todos os reagentes menos a amostra, que foi utilizado para zerar o espectrofotômetro. O aumento na absorbância de 0,01 correspondeu a uma unidade enzimática proteolítica (UEP). Os ensaios foram realizados em triplicata (NÖRNBERG et al., 2010).

De acordo com os resultados do teste de Shapiro-Wilk, os dados obtidos não apresentaram aderência à curva Normal de Gauss. Assim, a comparação entre os tratamentos nas diferentes temperaturas foi realizada pelo teste não paramétrico de comparações múltiplas entre tratamentos independentes, por meio do teste de

Kruskal-Wallis, com 95% de confiabilidade, utilizando-se o programa estatístico Statistica versão 8.0 (STATSOFT, 2009).

3.4. Avaliação do potencial enterotoxigênico de estirpes de *B. cereus* capazes de se multiplicar a 10 °C

Foram selecionadas 22 estirpes de *B. cereus* com capacidade de se multiplicar a 10 °C por 7 dias. Destas, 8 foram isoladas de leite em pó e 14 de leite pasteurizado. As culturas estocadas em TSA foram repicadas e incubadas em 20 mL de caldo BHI (Himedia) a 30 °C por 24h para avaliação da produção de enterotoxina HBL. As culturas também foram incubadas a 10 °C por 7 dias para avaliação da produção de enterotoxina HBL nesta temperatura.

Após este período, 2 mL do meio foi centrifugado a 900 g por 20 min a 4 °C e a presença da enterotoxina HBL foi avaliada no sobrenadante através do kit BCET-RPLA (Oxoid) de acordo com as especificações do fabricante. Foi conduzido em paralelo o controle negativo e positivo fornecido pelo kit. Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram aglutinação no látex.

3.5. Diferenciação genotípica de estirpes de *B. cereus* psicotróficas

As culturas que foram confirmadas como *B. cereus sensu stricto* foram submetidas às provas moleculares. Foram avaliadas 63 estirpes, sendo 36 isoladas de leite pasteurizado, 15 de leite em pó e 12 de leite UHT. As colônias estocadas em TSA foram cultivadas em caldo TSB e incubadas a 30 °C por 24h.

3.5.1. Extração do DNA

A metodologia de extração do DNA foi adaptada a partir do protocolo descrito por Moreira et al. (2010): as culturas ressuspendidas em TSB foram homogeneizadas em agitador tipo vortex. Após a homogeneização, foram transferidos 1,5 mL da cultura para microtubos plásticos e centrifugados por 1 min a

13.710 G. O líquido sobrenadante foi descartado e foi adicionado 450 µL de CTAB. Em seguida, os tubos foram agitados em vortex para ressuspender o precipitado e em vortex de bandeja por 1 min. As amostras foram sonicadas (sonicador PS-08A, Jeken) por 1 min e 30 seg em banho de gelo seguido da adição de 300 µL de CTAB. Foi feita a solubilização em banho-seco por 20 min a 65 °C e adicionado de 750 µL de clorofórmio. Os tubos foram novamente agitados por 5 min em vortex de bandeja e centrifugados por 7 min a 13.710 G. O sobrenadante foi transferido para outro microtubo e foram adicionados 750 µL de clorofórmio, seguido de agitação por 5 min no vortex de bandeja e centrifugação por 7 min a 13.710 G. O sobrenadante foi novamente transferido para outro microtubo e foram adicionados dois volumes de etanol 96% gelado, homogeneizando por inversão suavemente. Os tubos foram acomodados em freezer a -20 °C por 30 min e centrifugados por 7 min a 13.710 G; o líquido foi descartado e foram adicionados 750 µL de etanol 70% gelado. Os tubos foram novamente centrifugados por 7 min a 13.710 G e o líquido foi descartado; o *pellet* foi seco a temperatura ambiente e ressuspendido em 50 µL de água deionizada (Milli-Q, Millipore).

Todas as amostras foram submetidas à verificação da qualidade do DNA em gel de agarose 0,8% (Invitrogen) preparado com tampão TBE 1X (Tris-Borato EDTA) e submetido à eletroforese a 70V por 30 min, utilizando-se como marcador de peso molecular o 100 pb DNA ladder (Invitrogen).

O gel foi corado por 15 min em solução de brometo de etídio (2 µg/mL) e fotografado sob a incidência de UV em transiluminador com UV 320nm acoplado do sistema de fotodocumentação (Loccus L-PIX).

Além disso, a qualidade do DNA foi avaliada e quantificada a partir da leitura das amostras em NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). As amostras que apresentaram uma relação de 260 (absorção máxima ácidos nucleicos) / 280 (relação máxima proteínas) de 1,8 a 2,0 (equivalente a DNA puro) foram diluídas de modo a atingir uma concentração final de 100 µg/mL.

3.5.2. Detecção dos genes

Foram realizadas duas reações de PCR, sendo uma *simplex* amplificando uma região do gene *cspA*, e outra *duplex*, com finalidade de diferenciar estirpes mesófilas e psicrótróficas amplificando duas regiões diferentes do 16S rDNA.

Gene cspA

Uma região do gene *cspA* em estirpes de *B. cereus* foi amplificada utilizando os *primers* Bc-*cspA*-F1 e Bc-*cspA*-R1 (Invitrogen) (Tabela 3). As condições da reação de PCR foram adaptadas da metodologia descrita por Francis et al. (1998). O *Master Mix* para a reação de PCR foi composto por 1x de tampão, 2,00 mg/mol de MgCl₂, 0,2 mg/mol de solução de dNTPs, 37,5 pmol de cada *primer*, 1U de Taq DNA polimerase (Invitrogen) e 100 µg de DNA totalizando 25 µL.

As amplificações foram realizadas em termociclador (Veriti Applied Biosystems) utilizando as seguintes condições: desnaturação inicial a 95 °C por 1 min, 30 ciclos de 95 °C por 45 seg, pareamento a 52 °C por 1 min e extensão a 72 °C por 45 seg, seguido de extensão final de 72 °C por 7 min.

Alíquotas do produto da PCR foram aplicadas com tampão de carregamento azul de bromofenol em gel de agarose 1,0% (Invitrogen) preparado com tampão TBE 1X (Tris-Borato EDTA) e submetido à eletroforese a 80-100V até a amostra percorrer dois terços do gel, utilizando-se como marcador de peso molecular o 100 pb DNA ladder (Invitrogen).

O gel foi corado por 15 a 20 min em solução de brometo de etídio (1 µg/ml) e fotografado sob a incidência de luz UV (320nm) em transiluminador acoplado ao sistema de fotodocumentação (Loccus L-PIX). A presença do gene *cspA* gera um fragmento do DNA com 160 pares de bases.

Paralelamente a cada conjunto de amostras analisadas foi conduzida uma amostra de *B. cereus* ATCC 11778 como controle positivo e um controle negativo contendo todos os reagentes menos a amostra.

16S rDNA

A PCR *duplex* foi realizada utilizando os *primers* MF e UR (Invitrogen) que amplificam a região 16S rDNA que caracteriza o comportamento mesófilo, gerando um fragmento de 249 pb (Tabela 3). Os *primers* UF e PR (Invitrogen) amplificam a região 16S rDNA, que codifica o comportamento psicrotrófico, gerando um fragmento de 132 pb (STETTEN et al., 1998; STENFORS e GRANUM, 2001). As condições da reação de PCR foram adaptadas da metodologia descrita por Wijnands et al. (2002).

O *Master Mix* para a reação de PCR foi composto por 1x de tampão, 2,00 mg/mol de MgCl₂, 0,2 mg/mol de solução de dNTPs, 37,5 pmol de cada *primer*, 1U de Taq DNA polimerase (Invitrogen) e 100 µg de DNA totalizando 25 µL.

As ampliações foram realizadas em termociclador (Veriti Applied Biosystems) utilizando as seguintes condições: desnaturação inicial a 95 °C por 1 min, 30 ciclos de 95 °C por 45 seg, pareamento a 55 °C por 45 seg e extensão a 72 °C por 45 seg, seguidos de extensão final de 72 °C por sete min.

Alíquotas do produto da PCR foram aplicadas com tampão de carregamento azul de bromofenol em gel de agarose 1,0% (Invitrogen) preparado com tampão TBE 1x (Tris-Borato EDTA) e submetido à eletroforese a 80-100V até a amostra percorrer dois terços do gel, utilizando-se como marcador de peso molecular o 100 pb DNA ladder (Invitrogen).

O gel foi corado por 15 a 20 min em solução de brometo de etídio e fotografado sob a incidência de UV em transiluminador acoplado ao sistema de fotodocumentação (Loccus L-PIX). A presença do gene 16s rDNA gera um fragmento de DNA com 249 pb para estirpes mesófilas e/ou 132 pb para estirpes psicrotróficas.

Paralelamente a cada conjunto de amostras analisadas foi conduzida uma amostra de *B. cereus* ATCC 11778 como controle positivo e um controle negativo contendo todos os reagentes menos a amostra.

Tabela 3 – *Primers* utilizados no experimento, com temperatura de pareamento e o tamanho do fragmento esperado.

<i>Primer</i>	Gene	Temperatura de pareamento	Tamanho do fragmento amplificado	Sequência
Bc- <i>cspA</i> -F1	<i>cspA</i>	52 °C	160 pb	5' GAGGAAATAATTATGACAGTT 3' ^a
Bc- <i>cspA</i> -R1				5' CTTYTTGGCCTTCTTCTAA 3' ^a
MF	16S	55 °C	249 pb	5' ATAACATTTTGAACCGCATG 3' ^b
UR				5' CTTTCATCACTCACGCGGC 3' ^b
UF	16S	55 °C	132 pb	5' CAAGGCTGAAACTCAAAGGA 3' ^b
PR				5' GAGAAGCTCTATCTCTAGA 3' ^b

^a STETTEN et al., 1998. ^b STENFORS e GRANUM, 2001.

3.5.3. Sequenciamento

Duas amostras que apresentaram o gene *cspA* (LP34 e LP85) foram encaminhadas para o sequenciamento para avaliar se os *primers* estavam adequados e se a reação de PCR foi bem conduzida.

O sequenciamento foi realizado na empresa ACTGene Análises Moleculares Ltda. (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre-RS), utilizando o sequenciador automático ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer armado com capilares de 50 cm e polímero POP6 (Applied Biosystems). Os DNA-moldes (30 a 45 ng) foram marcados utilizando-se 3,2 pmol do *primer* Bc-*cspA*-F1 (gene *cspA*) e 3 µL do reagente BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100 (Applied Biosystems) em um volume final de 10 µL. As reações de marcação foram realizadas em termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems) com uma etapa de desnaturação inicial a 96 °C por 3 min seguida de 25 ciclos de 96 °C por 10 seg, 55 °C por 5 seg e 60 °C por 4 min. Uma vez marcadas, as amostras foram purificadas pela precipitação com isopropanol a 75% e lavagem com etanol a 60%. Os produtos precipitados foram diluídos em 10 µL de formamida Hi-Fi (Applied Biosystems), desnaturados a 95 °C por 5 min, resfriados em gelo por 5 min e eletro-injetados no sequenciador automático. Os dados de sequenciamento foram coletados utilizando-se o programa

Data Collection v 1.0.1 (Applied Biosystems) com os parâmetros *Dye Set* “Z”; *Mobility File* “DT3100POP6{BDv3}v1.mob”; *BioLIMS Project* “3100_Project1”; *Run Module 1* “StdSeq50_POP6_50cm_cfv_100”; e *Analysis Module 1* “BC-3100SR_Seq_FASTA.saz”.

As sequências resultantes foram alinhadas, com auxílio do programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) (ALTSCHUL et al., 1997) e comparadas com as sequências depositadas no GenBank.

3.6. Associação das características fenotípicas e genotípicas de *B. cereus* com relação ao seu comportamento psicrotrófico

Os resultados fenotípicos (multiplicação a 30 °C, 10 °C e 7 °C) e genotípicos (presença dos genes *cspA* e 16S rDNA mesófilo e psicrotrófico) foram tabulados, atribuindo o código 0 (zero) para os resultados negativos e 1 (um) para os resultados positivos. Os resultados foram analisados por teste multivariado de agrupamento (*cluster*), agrupados por grau de dissimilaridade entre os distintos resultados, utilizando-se o programa estatístico Statistica versão 8.0 (STATSOFT, 2009).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Estudo sobre a ocorrência de *B. cereus* em produtos lácteos

Na primeira fase do experimento *B. cereus* foi encontrado em 15 das 85 amostras (17,6%) de produtos lácteos refrigerados analisados, sendo quatro amostras de leite pasteurizado (4,7%), uma de creme de leite (1,2%), uma de queijo frescal (1,2%), quatro de manteiga (4,7%) e cinco de requeijão (5,9%) (Tabela 4).

Tabela 4 – Ocorrência de *B. cereus* em produtos lácteos refrigerados comercializados em Curitiba-PR no período de abril a junho/2009.

Produto	Amostras positivas	Percentual
Leite pasteurizado (n=17)	4	4,7%
Creme de leite (n=17)	1	1,2%
Queijo frescal (n=5)	1	1,2%
Manteiga (n=12)	4	4,7%
Requeijão (n=22)	5	5,9%
Outros produtos lácteos (n=12)	0	0
Total (n=85)	15	17,6%

A ocorrência de *B. cereus* nas amostras avaliadas nesta fase do experimento foram inferiores às relatadas por outros autores. Zhou et al. (2010) encontraram *B. cereus* em 60% das 40 amostras de sorvete avaliadas na China. Em outro estudo, também feito na China, foram avaliadas 293 amostras de produtos lácteos adquiridos no comércio e *B. cereus* foi detectado em 52% das amostras de sorvete, 29% das amostras de leite em pó, 17% das amostras de leite fermentado e 2% das amostras de leite pasteurizado e pasteurizado aromatizado (WONG et al., 1988).

Na Tabela 5 são apresentados os resultados da ocorrência de *B. cereus* em amostras de leite pasteurizado, leite em pó e leite UHT avaliados na segunda fase do experimento.

Pelo método quantitativo, 19/100 (19%) das amostras de leite pasteurizado avaliadas foram positivas para *B. cereus*, com contagens variando entre 1,00 e 1,74

Log UFC/mL. Para o leite em pó, 8/50 (16%) das amostras foram positivas, com contagens variando de 1,70 a 2,60 Log UFC/g. O leite UHT não apresentou resultados dentro do limite de detecção do método (>1 Log UFC/mL) para nenhuma das amostras avaliadas. Considerando todos os produtos avaliados, 27/260 (10,4%) apresentaram contaminação por *B. cereus*.

Tabela 5 – Ocorrência de *B. cereus* pelo método quantitativo e qualitativo em amostras de leite pasteurizado, leite em pó e leite UHT comercializadas nos estados do Paraná, São Paulo e Santa Catarina no período de março a dezembro de 2010.

Produto	Método Quantitativo		Método Qualitativo
	Média ¹ [Log UFC/mL (DP)]	Amostras positivas [n (%)]	Amostras Positivas [n (%)]
Leite pasteurizado (n=100)	1,25 (±0,27) ^b	19 (19%) ^a	24 (24%) ^{ab}
Leite em pó (n=50)	2,00 (±0,36) ^a	8 (16%) ^a	17 (34%) ^a
Leite UHT (n=110)	-	0 (0%) ^{B b}	18 (16,4%) ^{A b}
Total (n=260)	1,46 (±0,47)	27 (10,4%) ^B	59 (22%) ^A

¹ Resultados expressos em média ± DP (desvio padrão);

Letras maiúsculas distintas na mesma linha diferem significativamente pelo teste de Qui-quadrado exato de Fisher (p<0,05).
Letras minúsculas distintas na mesma coluna diferem significativamente pelo teste de Qui-quadrado exato Fisher (p<0,05).

Comparando-se os resultados de população em UFC/g, o leite em pó apresentou maior contaminação por *B. cereus* (p<0,05) do que leite pasteurizado. No entanto, nenhuma das amostras apresentou resultados acima do estabelecido pela legislação brasileira para leite em pó (5×10^3 UFC/g) (BRASIL, 2001).

Os valores encontrados no presente trabalho foram menores que os relatados por Larsen e Jorgensen (1997), que encontraram 56% das amostras de leite pasteurizado obtidas na Dinamarca contaminadas por *B. cereus*, sendo que 45% destas apresentaram contagens superiores a 3,00 Log UFC/mL.

A ocorrência de *B. cereus* nos produtos lácteos avaliados e o nível de contaminação das amostras por este micro-organismo foi considerada inferior ao relatado em outros trabalhos (WONG et al., 1988; LARSEN e JORGENSEN, 1997; GIFFEL et al., 1997; GARCÍA-ARMESTO e SUTHERLAND, 1997; ZHOU et al.,

2010). As condições da produção de leite no Brasil (microbiota competidora, alimentação a pasto, condições de processamento, entre outros) podem inibir a disseminação deste micro-organismo no leite e, conseqüentemente, nos produtos lácteos.

Pelo teste qualitativo, 59 das 260 amostras (22%) foram positivas para *B. cereus*, sendo 24 de leite pasteurizado (24%), 17 de leite em pó (34%) e 18 de leite UHT (16,4%) (Tabela 5). Em Ribeirão Preto-SP, Rezende-Lago et al. (2007) encontraram, utilizando a mesma técnica, 96,7% das amostras de leite pasteurizado, 73,3% de leite em pó e 13,3% de leite UHT contaminadas por *B. cereus*. Na mesma cidade, Vidal-Martins et al. (2005) constataram a presença dessa bactéria em 11,8% de amostras de leite UHT.

Para as amostras de leite pasteurizado e leite em pó, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) na positividade entre os métodos quantitativo e qualitativo. Para as amostras de leite UHT, *B. cereus* foi isolado somente pelo método qualitativo (enriquecimento seletivo), indicando que este micro-organismo está presente em pequenas quantidades.

A técnica de enriquecimento seletivo possibilitou a detecção de *B. cereus* em amostras que não apresentaram contagem pelo método de semeadura direta, indicando que a contaminação está abaixo dos limites de detecção do método quantitativo (mínimo de 10 UFC/mL).

O método qualitativo é indicado para amostras processadas termicamente, nas quais as contagens bacterianas são baixas, muitas vezes abaixo do limite de detecção do método quantitativo. Por esses resultados, pode-se observar que o método qualitativo é uma importante alternativa para melhorar a eficiência de detecção de amostras positivas, evitando assim resultados falso-negativos.

As amostras de leite em pó foram as que apresentaram maior positividade, seguida pelas amostras de leite pasteurizado. A pasteurização aplicada como pré-tratamento ao processo de desidratação do leite não é suficiente para a destruição dos esporos, chegando inclusive a aumentar o número de células viáveis de bacilos

termodúricos após o tratamento térmico, devido à ativação dos seus esporos (YUAN et al., 2012).

A baixa atividade de água do leite em pó garante sua estabilidade (CHEN et al., 2003), no entanto, quando reconstituído e armazenado em condições inadequadas, pode representar um risco potencial à saúde do consumidor, uma vez que os esporos presentes podem passar para a forma vegetativa (BARROS et al., 2001).

Os esporos de *B. cereus* germinam após o tratamento térmico do leite. A temperatura ótima de ativação é de 65 a 75 °C, ou seja, a faixa de temperatura utilizada na pasteurização do leite. Aproximadamente, 95% dos esporos podem ser ativados pela pasteurização (MEER et al., 1991). Considerando que os esporos podem germinar e se multiplicar após o processamento térmico, a presença deste micro-organismo nos produtos lácteos pode ser considerada um problema para a indústria e para o consumidor (DUFRENNE et al., 1995; LARSEN e JORGENSEN, 1999).

O leite pasteurizado, mesmo com baixas contagens iniciais de *B. cereus*, estocado em temperatura acima do recomendado, pode atingir níveis de contaminação passíveis de causar risco à saúde do consumidor, dependendo do nível inicial de contaminação e do tempo/temperatura a que este leite foi exposto (NOTERMANS et al., 1997). Larsen e Jorgensen (1999) encontraram baixas contagens de *B. cereus* (<10 a 10^2 UFC/mL) em duas de 27 amostras de leite recém-pasteurizado, no entanto, após oito dias de estocagem a 7 °C, as contagens ultrapassaram 10^5 UFC/mL e 24 das 27 amostras estavam contaminadas. Este é um fato importante a ser considerado, pois a positividade pode ser maior ou menor em uma amostragem dependendo do período do prazo de validade que as amostras se encontram. Valík et al. (2003) confirmam que temperaturas de estocagem de leite pasteurizado acima de 9 °C comprometem a inocuidade do produto com relação a *B. cereus*.

4.2. Identificação do comportamento psicrotrófico e atividade proteolítica e lipolítica

A identificação do comportamento psicrotrófico, atividade proteolítica e lipolítica foi realizada nas 101 estirpes de *B. cereus* isoladas das 345 amostras de leite e derivados lácteos avaliadas no presente trabalho.

A avaliação do comportamento psicrotrófico das estirpes de *B. cereus* isoladas de leite e derivados lácteos está apresentada na Tabela 6.

Tabela 6 – Avaliação do comportamento psicrotrófico de estirpes de *B. cereus* isoladas de leite e derivados lácteos.

Produto	Nº estirpes avaliadas	Amostras positivas a 10 °C / 7 dias	Amostras positivas a 7 °C / 10 dias
Leite pasteurizado (n=117)	47	46 (97,9%) ^A	2 (4,2%) ^B
Leite em pó (n=50)	25	22 (88,0%) ^A	0 (0,0%) ^B
Leite UHT (n=110)	18	8 (44,4%) ^A	0 (0,0%) ^B
Outros produtos lácteos* (n= 68)	11	9 (81,8%) ^A	2 (4,2%) ^B
Total	101	85 (84,1%) ^A	4 (3,96%) ^B

Letras maiúsculas distintas na mesma linha diferem significativamente pelo teste de Qui-quadrado exato de Fisher ($p < 0,05$).

* creme de leite pasteurizado, queijo frescal, manteiga e requeijão

A 10 °C, 84,1% das estirpes de *B. cereus* isoladas se multiplicaram, enquanto que a 7 °C somente 3,96% se desenvolveu, uma quantidade significativamente menor ($p < 0,05$). Considerando a definição de psicrotróficos (micro-organismos que se multiplicam a 7 °C ou menos), a ocorrência de estirpes de *B. cereus* psicrotróficas encontradas neste trabalho foi considerada baixa em comparação ao relatado em outros países (VAISANEN et al., 1991; GRANUM et al., 1993; GIFFEL et al., 1997). Giffel et al. (1997) detectaram que todas as 106 estirpes de *B. cereus* isoladas em produtos lácteos na Holanda foram capazes de se multiplicar a 10 °C por 7 dias e 56 (53%) a 7 °C pelo mesmo período. García-Armesto e Sutherland (1997) avaliaram 50 estirpes de *Bacillus* spp. isoladas em leite e derivados comercializados na Espanha e identificaram 26 (52%) como sendo *B. cereus* psicrotrófico, capaz de se multiplicar a 6,5 °C por 10 dias.

Estes dados indicam que o comportamento de *B. cereus* isolado na região deste estudo é predominantemente mesófilo, provavelmente pelas condições climáticas que favorecem este comportamento. As quatro estirpes que se multiplicaram a 7 °C foram, posteriormente, identificadas por provas bioquímicas como não sendo *B. cereus sensu stricto*. Estas estirpes podem ser de *B. weithenstephanensis*, considerada uma espécie psicrotrófica pertencente ao grupo *B. cereus*, contudo, tal afirmação só pode ser confirmada por meio de provas bioquímicas específicas para a identificação deste micro-organismo.

A avaliação da atividade lipolítica das estirpes de *B. cereus* isoladas de leite e derivados lácteos está apresentada na Tabela 7.

Tabela 7 – Avaliação da atividade lipolítica de estirpes de *B. cereus* isoladas em amostras de leite e derivados lácteos em diferentes temperaturas.

Produto	Nº estirpes avaliadas	Estirpes lipolíticas a 30 °C / 48h	Estirpes lipolíticas a 10 °C / 7 dias	Estirpes lipolíticas a 7 °C / 10 dias
Leite pasteurizado (n=117)	47	1 ^B	8 ^A	0 ^B
Leite em pó (n=50)	25	1 ^{AB}	6 ^A	0 ^B
Leite UHT (n=110)	18	0	0	0
Outros produtos lácteos* (n= 68)	11	4	1	0
Total	101	6^A (5,9%)	15^A (14,8%)	0^B (0,0%)

Letras maiúsculas distintas na mesma linha diferem significativamente pelo teste de Qui-quadrado exato de Fisher ($p < 0,05$).

Seis estirpes (5,9%) de *B. cereus* apresentaram atividade lipolítica a 30 °C e nenhuma a 7 °C (Tabela 7). No entanto, a 10 °C, 14,8% das estirpes apresentaram produção de lipases. Com base neste resultado, a produção de lipases por *B. cereus* parece ser maior na faixa de 10 °C. No entanto, a ocorrência de estirpes lipolíticas foi considerada baixa, comparado àquela de estirpes proteolíticas (Tabela 8). Este fato também foi relatado por de Jonghe et al. (2010), que encontraram estirpes de *B. cereus* com maior atividade proteolítica do que lipolítica.

Matta e Punj (1999) avaliaram 100 amostras de leite cru obtidos na Índia e encontraram 48% das amostras contaminadas por *Bacillus* spp. psicrótrópicos a 4 °C e com atividade lipolítica. Destas, 32,2% foram identificadas como sendo *B. cereus*.

As lipases atuam sobre os ácidos graxos do leite causando a formação de sabores desagradáveis em leite pasteurizado, UHT e no leite em pó (ANDERSON et al., 1981; CHEN et al., 2003).

Todas as estirpes de *B. cereus* isoladas em leite pasteurizado, leite em pó e leite UHT apresentaram atividade proteolítica a 30 °C (Tabela 8). Este é um dado preocupante para amostras armazenadas a temperatura ambiente, como o leite UHT e o leite em pó. A 10 °C por 7 dias, 67,3% apresentaram atividade proteolítica e a 7 °C, somente 3,9%, uma quantidade significativamente menor ($p < 0,05$).

Tabela 8 – Avaliação da atividade proteolítica de estirpes de *B. cereus* isoladas em amostras de leite e derivados lácteos em diferentes temperaturas.

Produto	Nº estirpes avaliadas	Estirpes proteolíticas a 30 °C / 48h	Estirpes proteolíticas a 10 °C / 7 dias	Estirpes proteolíticas a 7 °C / 10 dias
Leite pasteurizado (n=117)	47	47 ^A	35 ^A	0 ^B
Leite em pó (n=50)	25	25 ^A	20 ^A	0 ^B
Leite UHT (n=110)	18	18 ^A	8 ^{AB}	4 ^B
Outros produtos lácteos* (n= 68)	11	11 ^A	5 ^A	0 ^B
Total	101	101 (100,0%) ^A	68 (67,3%) ^A	4 (3,9%) ^B

Letras maiúsculas distintas na mesma linha diferem significativamente pelo teste de Qui-quadrado exato de Fisher ($p < 0,05$).

Os dados encontrados no presente estudo para 30 °C e a 10 °C foram superiores aos relatados por Murugan e Villi (2009), que encontraram 64% das estirpes de *B. cereus* com atividade proteolítica a 37 °C.

As proteases podem causar sabores desagradáveis e geleificação em leite UHT (SILVA, 2004; VIDAL-MARTINS, 2005; JANSTOVÁ et al., 2006; MURUGAN e VILLI, 2009), provocar a formação de gosto amargo e diminuição na solubilidade de leite em pó (CELESTINO et al., 1997; CHEN et al., 2003).

Seis estirpes de *B. cereus* (5,9%) apresentaram atividade conjunta lipolítica e proteolítica a 30 °C. Este resultado foi inferior ao relatada por Chen et al. (2004), que encontraram todas as sete estirpes de *Bacillus* spp. isoladas em leite em pó capazes de sintetizar ambas as enzimas a 37 °C, temperatura que não foi avaliada no presente estudo.

A incidência de estirpes proteolíticas e lipolíticas em temperatura de refrigeração (7 °C) foi inferior ao esperado, com base na literatura consultada na revisão bibliográfica (GIFFEL et al., 1997; GARCÍA-ARMESTO e SUTHERLAND, 1997; SVENSSON et al., 2004; ZHOU et al., 2010). Esse dado é indicativo que os problemas tecnológicos causados pela ação destas enzimas nos produtos lácteos refrigerados não são tão impactantes nos produtos comercializados na região do estudo quando comparados com o descrito em outros países.

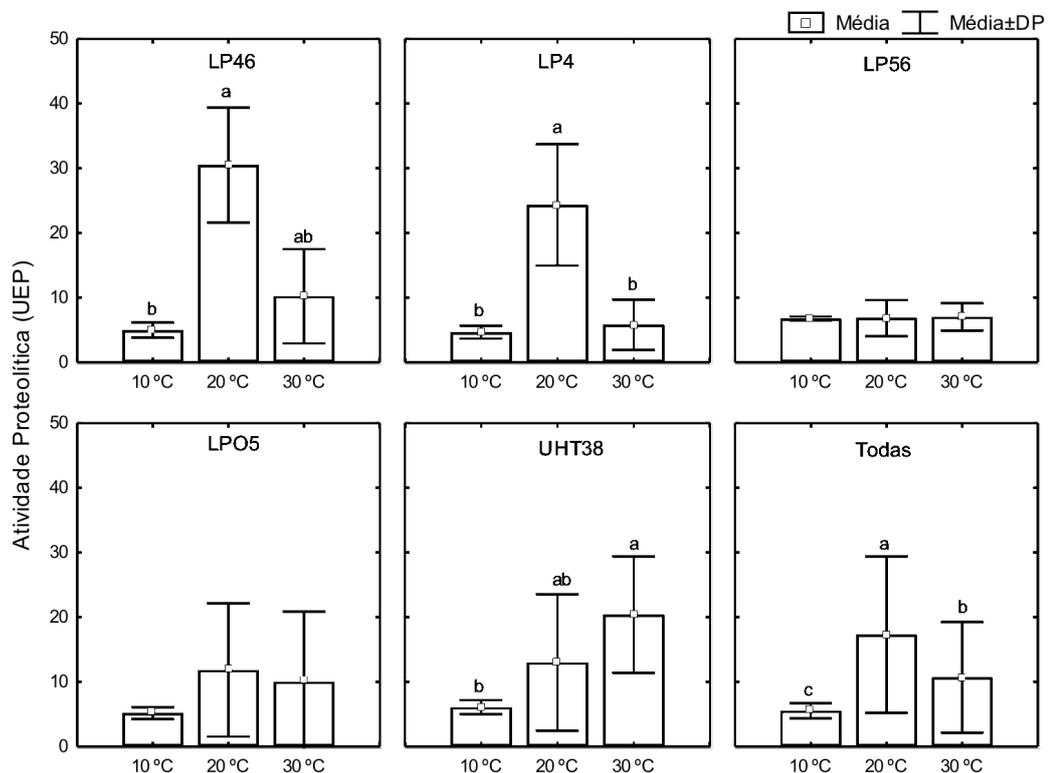
A temperatura de 7 °C inibiu a produção tanto de lipases (Tabela 7) e reduziu a produção de proteases (Tabela 8), indicando que a refrigeração adequada de produtos lácteos perecíveis é suficiente para garantir sua estabilidade com relação às enzimas produzidas por *B. cereus*. No entanto, não é raro encontrar produtos perecíveis expostos a temperaturas acima do recomendado em gôndolas de supermercados e padarias, bem como durante o transporte destes produtos. Sendo assim, temperaturas marginais de refrigeração representam um potencial deteriorante para os produtos lácteos, uma vez que *B. cereus* apresenta elevada atividade metabólica a 10 °C, se multiplicando e produzindo lipases e proteases, sendo, portanto, uma temperatura crítica para o armazenamento de produtos lácteos.

Janstová et al. (2006) relataram que amostras de leite UHT estocado por quatro meses a 4 °C não apresentaram alterações devido à ação de lipases e proteases. No entanto, quando estocadas a 24 °C, alterações sensoriais foram detectadas em três semanas, bem como redução no teor de proteína e tirosina livre e aumento do teor de ácidos graxos livres.

A atenção da indústria e dos pesquisadores deve estar voltada a produtos lácteos armazenados em temperatura ambiente, uma vez que a ocorrência de estirpes produtoras de proteases foi máxima a 30 °C. Considerando que esses produtos apresentam um longo prazo de validade, essas enzimas poderão atuar sobre as proteínas alterando suas características sensoriais.

4.3. Determinação da temperatura ótima de produção de proteases

A Figura 2 apresenta os resultados da produção de proteases por cinco estirpes de *B. cereus* a 10 °C, 20 °C e 30 °C.



* Barras com letras distintas diferem ($p < 0,05$) pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

Figura 2 – Atividade proteolítica em diferentes temperaturas de diferentes estirpes de *B. cereus* isolado em produtos lácteos.

As estirpes LP46 e LP4 apresentaram uma produção de proteases significativamente maior ($p < 0,05$) a 20 °C. Já as estirpes LP56 e LP5 não apresentaram diferenças significativas na produção proteases nas três temperaturas

testadas. A estirpe UHT38 apresentou maior produção de proteases a 30 °C. Não foi observada uma regularidade de comportamento em estirpes isoladas do mesmo produto (LP46, LP4 e LP56).

Nornberg et al. (2009) também relataram uma grande variabilidade na atividade proteolítica de micro-organismos psicotróficos, sendo que algumas apresentaram elevada atividade e outras mostraram atividade muito baixa. Estes dados reforçam que diferentes estirpes de uma mesma espécie podem apresentar comportamentos distintos, ou seja, algumas apresentam maior atividade proteolítica em determinada temperatura, enquanto que outras parecem não sofrer influência da variação de temperatura na produção de proteases.

Agrupando as cinco estirpes de *B. cereus* na determinação da produção de proteases em diferentes temperaturas, houve maior atividade proteolítica a 20 °C e, a 10 °C, a menor atividade (Figura 2, "Todas"). Os resultados para as três temperaturas testadas diferiram significativamente ($p < 0,05$) entre si pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Não foram observadas regressões linear e quadrática significativas para as temperaturas testadas.

Estes resultados são semelhantes ao relatado por Wang e Jayarao (2001), que observaram uma maior produção de proteases por *Pseudomonas fluorescens* a 22 °C do que a 7 °C e a 32 °C. A maior produção de proteases a 20 °C representa um potencial deteriorante em amostras armazenadas em temperatura ambiente, considerando que esta é a faixa de temperatura média anual na região Sul do Brasil (SIMEPAR, 2011).

Comparando esses resultados com os obtidos na avaliação da ocorrência de *B. cereus* em produtos lácteos diversos e identificação do comportamento psicotrófico, atividade lipolítica e proteolítica das estirpes isoladas, percebe-se que houve uma maior ocorrência de estirpes de *B. cereus* proteolíticas a 30 °C, contudo, a produção de proteases foi maior na faixa dos 20 °C. Também é possível observar que, apesar de haver uma alta incidência de estirpes proteolíticas a 10 °C, a produção de proteases nesta temperatura foi inferior às demais.

Isto ocorre porque algumas linhagens de bactérias psicotróficas apresentam maior capacidade proteolítica do que outras e algumas apresentam atividade proteolítica em distintas faixas de temperatura (NÖRNBERG et al., 2009).

4.4. Avaliação do potencial enterotoxigênico de estirpes de *B. cereus* capazes de se multiplicar a 10 °C

Todas as 22 estirpes de *B. cereus* capazes de se multiplicar a 10 °C produziram a enterotoxina HBL. Estes dados acordam com os encontrados por Dufrenne et al. (1995), que encontraram todas as 12 estirpes de *B. cereus* psicotróficas avaliadas capazes de produzir enterotoxinas.

O potencial patogênico de estirpes psicotróficas de *B. cereus* vem sendo pesquisado há algum tempo (CHRISTIANSSON et al., 1989; DUFRENNE et al., 1995; SVENSSON et al., 2007). Svensson et al. (2007) afirmaram que estirpes psicotróficas de *B. cereus* apresentam menor potencial toxigênico do que estirpes mesófilas com relação à enterotoxina HBL.

Wijnands et al. (2006) relataram que estirpes mesófilas de *B. cereus* representam maior perigo, uma vez que germinam melhor e mais rapidamente no trato intestinal do que estirpes psicotróficas. Considerando que as estirpes que se multiplicam a 10 °C são consideradas mesófilas, a capacidade destas estirpes de produzirem a enterotoxina HBL pode ser considerada um risco à saúde pública.

Das 22 estirpes produtoras de enterotoxina HBL a 30 °C, nove (41%) produziram a enterotoxina também a 10 °C. Fermanian et al. (1997) verificaram a capacidade de estirpes de *B. cereus* produzirem toxinas diarreicas em baixas temperaturas e verificaram que todas as estirpes toxigênicas a 32 °C foram também toxigênicas a 10 °C. Os autores utilizaram o mesmo kit (RPLA – Oxoid) utilizado neste experimento.

A temperatura recomendada para estocagem de produtos refrigerados é de, no máximo 7 °C, no entanto, em regiões tropicais não é raro encontrar produtos armazenados em temperaturas acima do indicado. A presença de estirpes patogênicas capazes de se multiplicar a 10 °C representa um perigo à saúde do

consumidor para produtos lácteos armazenados nesta temperatura, uma vez que, de acordo com os resultados deste trabalho, *B. cereus* pode estar presente nestes produtos e pode apresentar potencial patogênico.

4.5. Diferenciação genotípica de estirpes de *B. cereus* psicotróficas

Das 101 estirpes do grupo *B. cereus*, submetidas à segunda série de provas bioquímicas feitas para diferenciar *B. cereus sensu stricto* dos demais membros do grupo, foram obtidas 63 estirpes de *B. cereus sensu stricto* que foram submetidas às análises moleculares.

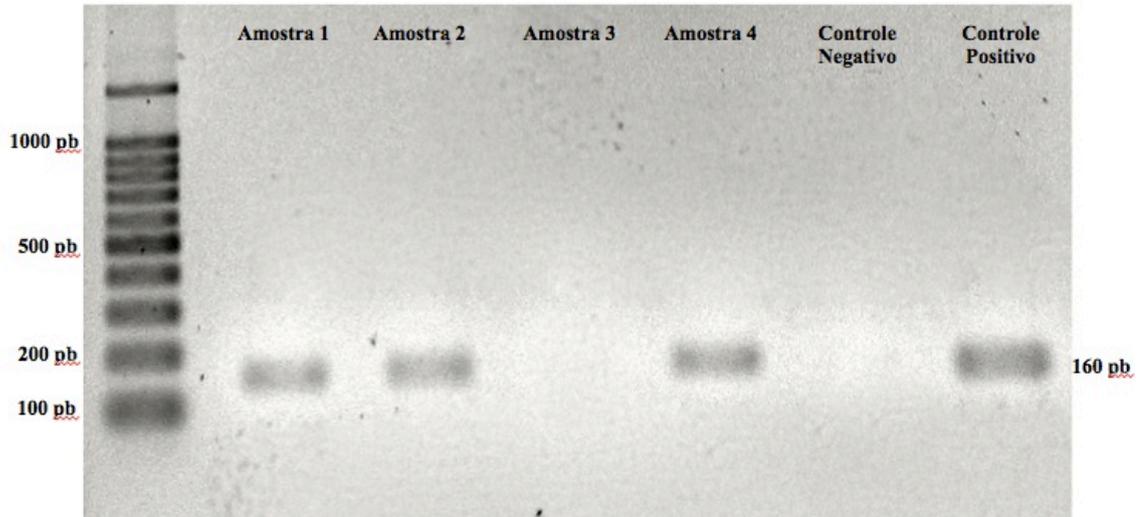
Das 63 estirpes de *B. cereus sensu stricto* isoladas em produtos lácteos, 25 (39,7%) apresentaram o gene *cspA* (Tabela 9 e ANEXO). Esta porcentagem foi inferior ao relatado por Svensson et al. (2007), que encontraram 58% de 396 estirpes de *B. cereus* isoladas de produtos lácteos com o gene *cspA*.

Tabela 9 – Resultados fenotípicos e genotípicos de estirpes de *B. cereus sensu stricto* isoladas em produtos lácteos, de acordo com a atividade psicotrófica.

Produto	Fenótipo				Genótipo				
	Multiplicação a 7 °C / 10 dias		Multiplicação a 10 °C / 7 dias		Gene <i>cspA</i>		16S rDNA		
	Posit.	Negat.	Posit.	Negat.	Posit.	Negat.	M	P	M/P
Leite em pó	0	15	14	1	5	10	4	0	11
Leite UHT	0	12	5	7	2	10	2	0	10
Leite Pasteurizado	0	36	35	1	18	18	18	1	17
Total	0	63	54	9	25	38	24	1	38

M: Somente Mesófilo; P: Somente Psicotrófico; M/P: Mesófilo e Psicotrófico.

A Figura 3 é um exemplo dos géis obtidos a partir da PCR do gene *cspA* de *B. cereus*; a amplificação das amostras na sequência com 160 pb indica que a amostra apresenta o gene *cspA*, ou seja, é classificada como sendo psicotrófica genotípicamente.



Fonte: AUTOR.

Figura 3 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados por PCR do gene *cspA* de *B. cereus* isolados em produtos lácteos.

Nenhuma das estirpes submetidas à análise molecular se multiplicou a 7 °C, mesmo as que apresentaram o gene *cspA*, indicando que, apesar das estirpes apresentarem o gene, este não está sendo expresso. São consideradas como estirpes psicrotróficas aquelas capazes de se multiplicar em temperaturas a 7 °C ou menos (FAIRBAIRN e LAW, 1986; SORHAUG e STEPANIAK, 1997; ALMEIDA et al., 2000; SANTANA et al., 2001). As estirpes que não se multiplicam a 7 °C, mas se multiplicam a 10 °C, são classificadas como mesófilas (LECHNER et al.; 1998).

Stenfors e Granum (2001), utilizando o mesmo *primer* amplificador da sequência do gene *cspA* em 26 estirpes de *B. cereus*, também encontraram estirpes que apresentaram o gene *cspA*, mas não se multiplicaram a 6 °C.

Não houve concordância ($p > 0,05$) com os resultados fenotípicos das estirpes incubadas a 10 °C com a presença do gene *cspA*, indicando que a multiplicação das estirpes nesta temperatura não tem ligação à presença deste gene.

Mesmo apresentando o gene *cspA*, *B. cereus* necessita de um tempo de adaptação ao frio para começar a se multiplicar, apresentando uma longa fase de colonização em baixas temperaturas, fato que pode explicar a negatividade das amostras incubadas a 7 °C por 10 dias. Este tempo de adaptação é necessário, pois o micro-organismo precisa ajustar todas suas atividades metabólicas (CARLIN et al.,

2010). Possivelmente, aumentando esse tempo de incubação ou repicando as estirpes sucessivas vezes nestas condições, o gene seria induzido a se expressar.

Stetten et al. (1999) afirmam que a presença e expressão gênica sofrem influência da condição climática da região em que a cultura foi isolada. Estirpes de *B. cereus* isoladas em regiões de clima temperado apresentam uma incidência significativamente menor do gene *cspA* do que as isoladas em regiões de clima alpino. Os autores encontraram 16% das estirpes de *B. cereus* com o gene *cspA*, mas que não se multiplicaram a 7 °C, ou seja, apresentaram o genótipo, mas não expressaram o fenótipo e concluíram que *B. cereus* isolado em regiões tropicais raramente apresenta comportamento psicrotrófico. Estas estirpes foram classificadas como intermediárias com relação ao comportamento psicrotrófico e podem apresentar adaptação térmica às condições climáticas (STETTEN et al., 1999; STENFORS e GRANUM, 2001).

No estudo feito na Alemanha por Francis et al. (1998), todas as estirpes de *B. cereus* isoladas em produtos lácteos que apresentaram o gene *cspA* se multiplicaram a 7 °C, apresentando concordância entre os resultados genotípicos e fenotípicos. Contudo, Borge et al. (2001) encontraram na Noruega sete de 11 estirpes de *B. cereus* capazes de se multiplicar a 7 °C sem apresentar o gene *cspA*. Zhou et al. (2010) isolaram 109 estirpes de *B. cereus* em amostras de sorvete na China, destas, 41 se multiplicaram a 7 °C sendo classificadas como psicrotróficas, no entanto, somente quatro estirpes (9,5%) apresentaram o gene *cspA*. Esses dados indicam que a presença do gene *cspA* não seria a única característica genotípica que define o comportamento psicrotrófico de *B. cereus*.

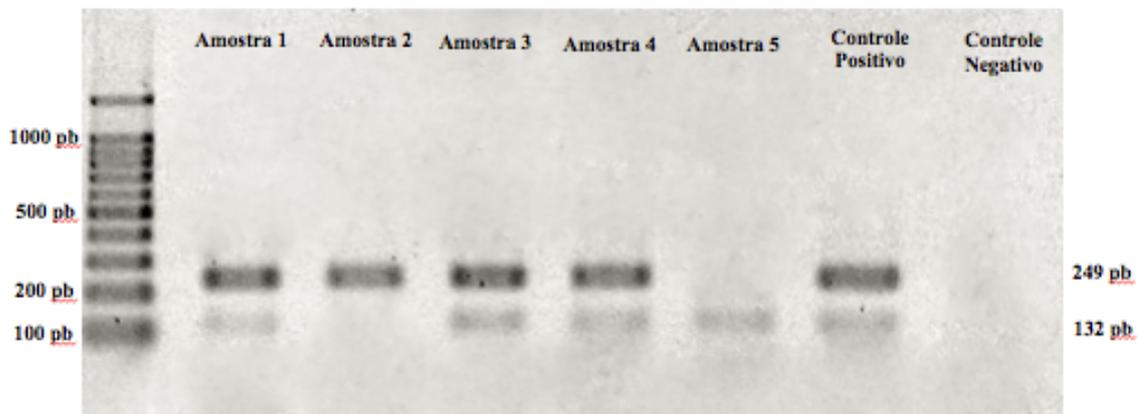
O resultado do sequenciamento genético indicou que o gene *cspA* das estirpes testadas apresentaram 93% de similaridade com o gene *cspA* de *B. cereus* ATCC10987, indicando que o *primer* e as condições da PCR estavam adequadas para o presente estudo.

Das 63 estirpes de *B. cereus sensu stricto*, 38 apresentaram assinaturas mesófilas e psicrotróficas (Tabela 9). A presença de assinaturas psicrotróficas e

mesófilas na maioria das estirpes de *B. cereus* avaliadas neste estudo pode ser indicativa de que estes comportamentos são simultâneos.

Vinte e quatro estirpes apresentaram somente assinatura mesófila e uma apresentou somente assinatura psicrotrófica. A presença da assinatura psicrotrófica não apresentou concordância com os resultados fenotípicos (multiplicação a 7 °C). Stetten et al. (1999) classificaram as estirpes de *B. cereus* que apresentaram simultaneamente as assinaturas mesófilas e psicrotróficas na região 16S rDNA como estirpes intermediárias, ou seja, expressam o genótipo de acordo com as condições climáticas a que são expostas.

A Figura 4 é um exemplo dos géis obtidos a partir da PCR *duplex* da região 16S rDNA de *B. cereus*; a amplificação de fragmentos com 249 pb indica estirpes mesófilas, enquanto que a amplificação de fragmentos com 132 pb indica comportamento psicrotrófico.



Fonte: AUTOR.

Figura 4 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados por PCR *duplex* da região 16S rDNA de *B. cereus* isolados em produtos lácteos.

4.6. Associação das características fenotípicas e genotípicas de *B. cereus* com relação ao seu comportamento psicrotrófico

A partir de análise multivariada de agrupamento entre as análises fenotípicas e genotípicas de *B. cereus* (Figura 5) fica evidente que somente a presença do gene

cspA ou do 16S rDNA psicrotrófico não confere a capacidade de *B. cereus* se multiplicar a 7 °C, ou seja, outros fatores podem conferir o comportamento psicrotrófico deste micro-organismo.

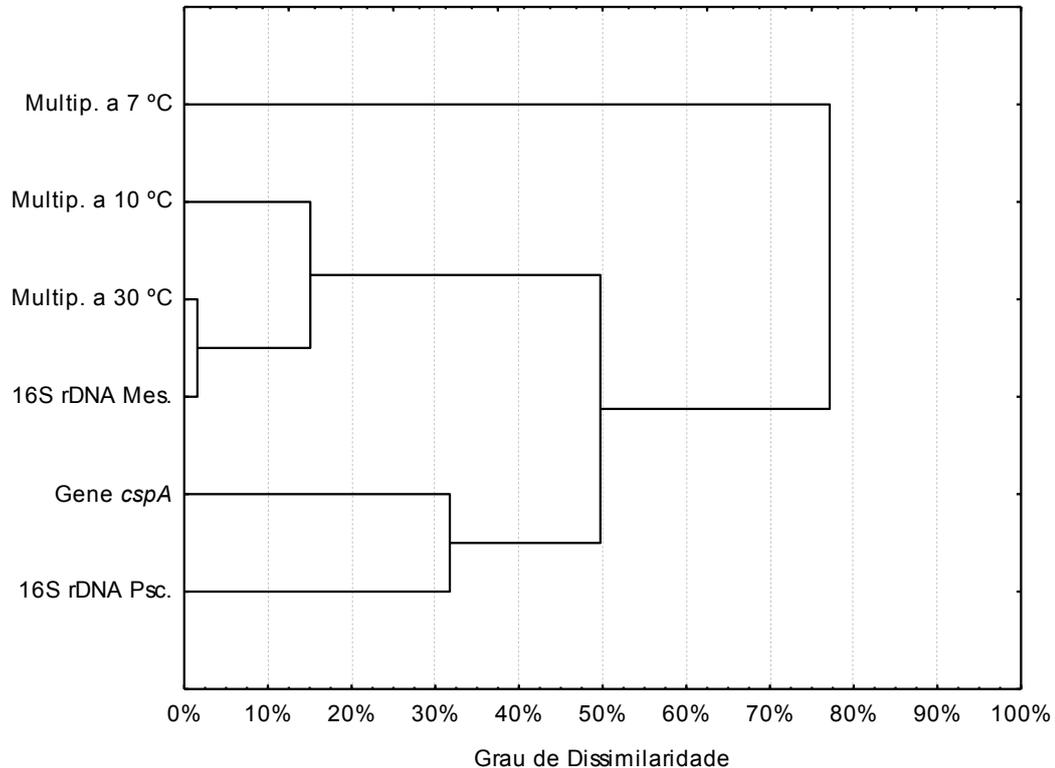


Figura 5 – Dendrograma de comparação por grau de dissimilaridade entre as análises fenotípicas e genotípicas de estirpes de *B. cereus sensu stricto* isoladas em produtos lácteos.

Os dados do presente estudo divergem do relatado por Stetten et al. (1998), que encontraram 100% de correlação entre os resultados da PCR e os resultados fenotípicos (crescimento a 30 °C e a 7 °C). As estirpes testadas por estes autores foram isoladas em produtos lácteos comercializados na Europa; a distribuição geográfica pode exercer influência na presença e expressão dos genes, justificando as diferenças encontradas no presente estudo.

Os dados da Tabela 10 confirmam o que foi observado pela análise multivariada de agrupamento entre as análises fenotípicas e genotípicas de *B. cereus* (Figura 5). Semelhança estatística significativa ($p > 0,05$) foi observada somente na multiplicação

a 30 °C com o 16S rDNA mesófilo. Todas as demais comparações apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$).

Tabela 10 – Matriz de semelhança estatística, por análise multivariada de agrupamento, entre os resultados de análises genótípicas e fenotípicas de *B. cereus sensu stricto* isoladas em produtos lácteos.

Análises	Multip. a 7 °C	Multip. a 10 °C	Multip. a 30 °C	16S rDNA Psicrotrófico	16S rDNA Mesófilo	Gene <i>cspA</i>
Multip. a 7 °C	-	33,7%	22,9%	69,2%	24,4%	52,2%
Multip. a 10 °C	33,7%	-	89,2%	59,9%	87,7%	64,5%
Multip. a 30 °C	22,9%	89,2%	-	53,7%	98,5%*	70,7%
16S rDNA Psi.	69,2%	59,9%	53,7%	-	52,2%	75,3%
16S rDNA Mes.	24,4%	87,7%	98,5%*	52,2%	-	69,2%
Gene <i>cspA</i>	52,2%	64,5%	70,7%	75,3%	69,2%	-

* Comparações com similaridade significativa ($p > 0,05$) pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

Houve maior grau de similaridade nos resultados fenotípicos de multiplicação a 30 °C com o 16S rDNA mesófilo, indicando que a multiplicação nesta temperatura é dependente da presença desta região. A multiplicação a 10 °C apresentou 87,7% de similaridade com a presença da banda mesófila na região 16S rDNA, indicando que a multiplicação nesta temperatura é associada ao comportamento mesófilo, ou seja, *B. cereus* é um micro-organismo mesófilo capaz de se multiplicar a 10 °C podendo ser definido como psicrotolerante.

Agrupando os resultados por tipo de produto (Figura 6), houve maior similaridade entre as estirpes de *B. cereus* isoladas em amostras de leite UHT e leite em pó quando comparadas com o leite pasteurizado. Considerando que o leite UHT e o leite em pó são armazenados a temperatura ambiente e o leite pasteurizado é refrigerado, é possível concluir que a temperatura de armazenagem das amostras pode selecionar a microbiota de *B. cereus* remanescente.

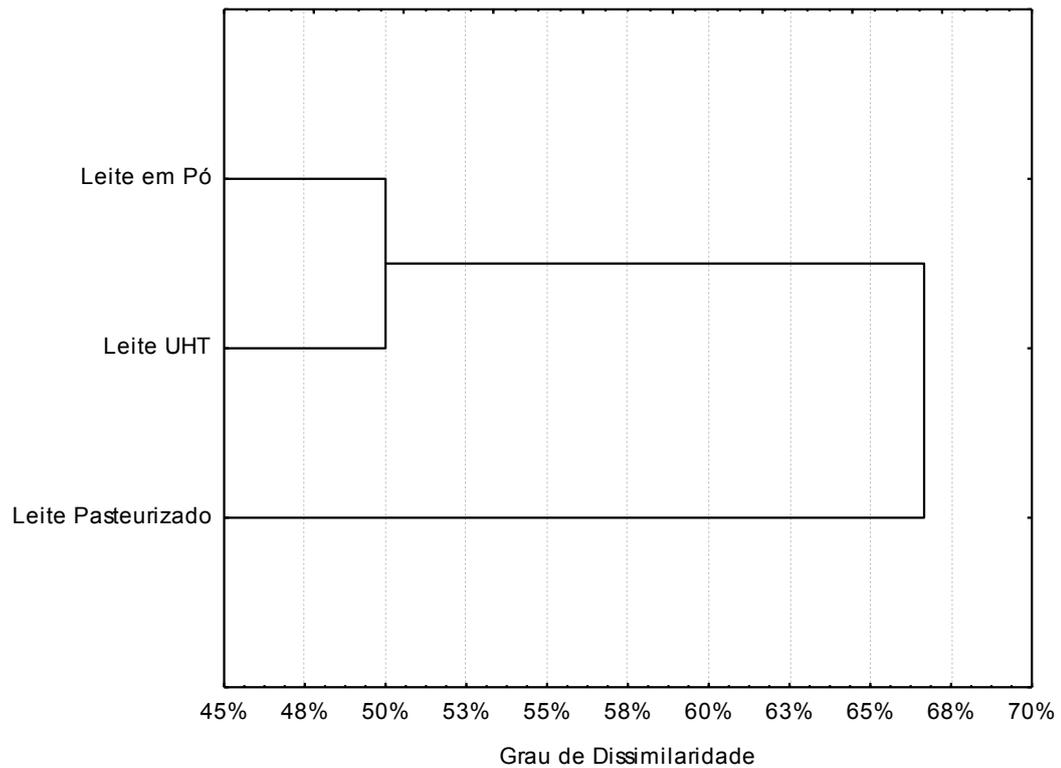


Figura 6 – Dendrograma de comparação por grau de dissimilaridade entre os produtos lácteos para os resultados fenotípicos e genotípicos de estirpes de *B. cereus sensu stricto*, de acordo com a atividade psicrotrofica.

A partir dos resultados do presente estudo, a ocorrência de *B. cereus* representa um maior problema para produtos lácteos armazenados em temperatura ambiente ou em temperaturas acima do recomendado, uma vez que a temperatura de 7 °C inibiu a multiplicação deste micro-organismo.

5. CONCLUSÃO

Os resultados do presente trabalho indicam que *B. cereus* está presente em leite pasteurizado, leite UHT, leite em pó e em outros produtos lácteos refrigerados. Mesmo em baixos níveis de contaminação, é imperativo o monitoramento de *B. cereus* em produtos lácteos devido ao seu potencial deteriorante e patogênico.

A baixa ocorrência de estirpes de *B. cereus* com comportamento psicrotrófico nos produtos lácteos avaliados permite inferir que o controle da presença de *B. cereus* em produtos lácteos seja mais crítico em produtos armazenados em temperaturas ambiente (30 °C) ou marginal de refrigeração (10 °C).

B. cereus apresenta baixa atividade lipolítica, por outro lado, seu potencial proteolítico é mais acentuado, sendo que a produção de proteases foi máxima em temperatura ambiente (20 °C). Em condições ideais de refrigeração (7 °C), há inibição da produção dessas enzimas. Estirpes de *B. cereus* capazes de se multiplicar a 10 °C apresentaram potencial enterotoxigênico. Produtos lácteos armazenados em condições não adequadas de refrigeração podem representar potencial risco à saúde pública e podem trazer problemas tecnológicos para a indústria de laticínios.

Apesar de haver presença de genótipo predisponente ao comportamento psicrotrófico, *B. cereus* apresenta fenótipo predominantemente mesófilo. Somente a presença do gene *cspA* ou da assinatura psicrotrófica na região 16S rDNA não garantem o comportamento psicrotrófico ao *B. cereus*, indicando que outros fatores contribuem na expressão desta característica.

6. REFERÊNCIAS

- ABEE, T.; GROOT, M.N.; TEMPELAARS, M.; ZWIETERING, M.; MOEZELAAR, R.; VOORT, M.V.D. Germination and outgrowth of spores of *Bacillus cereus* group members: diversity and role of germinant receptors. **Food Microbiology**, v.28, n.2, p.199-208, 2011.
- ADAMS, D.M.; BARACH, J.T.; SPECK, M.L. Heat resistant proteases produced by psychrotrophic bacteria of dairy origin. **Journal of Dairy Science**, v.58, n.6, p.828-834, 1975.
- ADAMS, D.M.; BRAWLEY, T.G. Heat resistant bacterial lipases and ultra-high temperature sterilization of dairy products. **Journal of Dairy Science**, v.64, n.10, p.1951-1957, 1981.
- AGATA, N.; OHTA, M.; MORI, M.; ISOBE, M., A novel dodecadedepsipeptide, cerulide, is an emetic toxin of *Bacillus cereus*. **FEMS Microbiology Letters**, v.129, n.1, p.17-20, 1995.
- AIRES, G.S.B.; WALTER, E.H.M.; JUNQUEIRA, V.C.A.; ROIG, S.M.; FARIA, J.A.F. *Bacillus cereus* in refrigerated milk submitted to different heat treatments. **Journal of Food Protection**, v.72, n.6, p.1301-1305, 2009.
- ARAGON-ALEGRO, L.C.; PALCICH, C.; LOPES, G.V.; RIBEIRO, V.B.; LANDGRAF, M.; DESTRO, M.T. Enterotoxigenic and genetic profiles of *Bacillus cereus* strains of food origin in Brazil. **Journal of Food Protection**, v.71, n.10, p.2115-2118, 2008.
- ALMEIDA, I.C.; SANTOS, E.S.; CARVALHO, E.P. Pesquisa de atividade lipolítica e/ou proteolítica em estirpes psicrotróficas de *Pseudomonas* spp. e *Bacillus* spp. **Higiene Alimentar**, v.14, n.71, p.58-60, 2000.
- ALTAYAR, M.; SUTHERLAND, A.D. *Bacillus cereus* is common in the environment but emetic toxin producing isolates are rare. **Journal of Applied Microbiology**, v.100, n.1, p.7-14, 2006.

- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v.25, n.17, p.3389-3402, 1997.
- ANDERSON, R.E.; DANIELSSON, G.; HEDLUND, C.B.; SVENSSON, S.G. Effect of a heat-resistant microbial lipase on flavor of ultra-high-temperature sterilized milk. **Journal of Dairy Science**, v.6, n.3, p.375-379, 1981.
- ANDERSON, R.E.; HEDLUND, C.B.; JONSSON, U. Thermal inactivation of a heat-resistant lipase produced by the psychrotrophic bacterium *Pseudomonas fluorescens*. **Journal of Dairy Science**, v.62, n.3, p.361-36, 1979.
- ANDERSSON, M.A.; JÄÄSKELÄINEN, E.L.; SHAHEEN, R.; PIRHONEN, T.; WIJNANDS, L.M.; SALKINOJA-SALONEN, M.S. Sperm bioassay for rapid detection of cereulide-producing *Bacillus cereus* in food and related environments. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, n.2, p.175-183, 2004.
- ARCURI, E.F.; BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; PINTO, S.M.; ÂNGELO, F.F.; SOUZA, G.N. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.3, p.440-446, 2006.
- ARNESEN, L.P.S.; FAGERLUND, A.; GRANUM, P.E. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. **FEMS Microbiology Reviews**, v.32, n.4, p.579-606, 2008.
- BANYKÓ, J.; VYLETELOVÁ, M. Determining the source of *Bacillus cereus* and *Bacillus licheniformis* isolated from raw milk, pasteurized milk and yoghurt. **Letters in Applied Microbiology**, v.48, n.3, p.318-323, 2009.
- BARACH, J.T.; ANAMS, D.M.; SPECK, M.L. Stabilization of a psychrotrophic *Pseudomonas* protease by calcium against thermal inactivation in milk at

- ultrahigh temperature. **Applied and Environmental Microbiology**, v.31, n.6, p.875-879, 1976.
- BARROS, V.R.M.; PANETTA, J.C.; MIGUEL, O. Occurrence and levels of *Bacillus cereus* in powder milk marketed in the city of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil - 1987/1988. **Revista de Educação Continuada**, v.4, n.1, p.45-52, 2001.
- BARTOSZEWICZ, M.; HANSEN, B.M.; SWIECICKA, I. The members of the *Bacillus cereus* group are commonly present contaminants of fresh and heat-treated milk. **Food Microbiology**, v.25, n.4, p.588-596, 2008.
- BEERENS, H.; LUQUET, F.M. **Guía practico para el análisis microbiológico de la leche y los productos lácteos**. Editorial Acríbia S.A. 141p., 1990.
- BENNET, R.W.; BELAY, N. *Bacillus cereus*. In: DOWNS, F.P.; ITO, K. (Eds.). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4^a Ed. American Public Health Association, Washington DC, EUA, 2001, p.311-316.
- BERNARDES, P.C. Modelagem da adesão de *Bacillus cereus* ao aço inoxidável em função do tempo e temperatura e influência da rugosidade e da hidrofobicidade sobre a adesão. **Dissertação de Mestrado** (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2008.
- BERSOT, L.S.; BARCELLOS, V.C.; FUJISAWA, F.M.; PEREIRA, J.G.; MAZIERO, M.T. Influência do sistema de estocagem na propriedade rural sobre a qualidade microbiológica do leite *in natura*. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.371, n.64, p.34-38, 2009.
- BORGE, G.I.A.; SKEIE, M.; SORHAUG, T.; LANGSRUD, T.; GRANUM, P.E. Growth and toxin profiles of *Bacillus cereus* isolated from different food sources. **International Journal of Food Microbiology**, v.69, n.3, p.237-246, 2001.
- BRADSHAW, J.G.; PEELER, J.T.; TWEDT, R.M. Heat resistance of ileal loop reactive *Bacillus cereus* strains isolated from commercially canned food. **Applied Microbiology**, v.30, n.6, p.943-945, 1975.

- BRASIL. Instrução Normativa nº 51 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Regulamentos técnicos de produção, identidade, qualidade, coleta e transporte de leite. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 set. 2002.
- BRASIL. Instrução Normativa nº 62 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, leite cru refrigerado e leite pasteurizado. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 29 dez. 2011.
- BRASIL. Portaria nº 146 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 11 mar. 1996.
- BRASIL. Resolução RDC nº 12 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2 jan. 2001.
- CANDRIAN, U. Polymerase chain reaction in food microbiology. **Journal of Microbiological Methods**, v.23, n.1, p.89-103, 1995.
- CARDOSO, R.R. Influência da microbiota psicrotrófica no rendimento de queijo minas frescal elaborado com leite estocado sob refrigeração. **Dissertação de Mestrado** (Mestrado em Microbiologia Agrícola), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2006.
- CARLIN, F.; BRILLARD, J.; BROUSSOLLE, V.; CLAVEL, T.; DUPORT, C.; JOBIN, M.; GUINEBRETIERE, M.H.; AUGER, S.; SOROKINE, A.; NGUYEN-THÉ, C. Adaptation of *Bacillus cereus*, an ubiquitous worldwide-distributed foodborne pathogen, to a changing environment. **Food Research International**, v.43, n.7, p.1885-1894, 2010.
- CELESTINO, E.L.; IYER, M.; ROGINSKI, H. The effects of refrigerated storage on the quality of raw milk. **Journal Society Dairy Technology**, v.51, n.2, p. 59-63, 1996.

- CELESTINO, E.L.; IYER, M.; ROGINSKI, H. The effects of refrigerated storage of raw milk on the quality of whole milk powder stored for different periods. **International Dairy Journal**, v.7, n.2, p.119-127, 1997.
- CHAMPAGNE, C.P.; LAING, R.R.; ROY, D.; MAFU, A.A. Psychrotrophs in dairy products: their effects and their control. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.34, n.1, p.1-30, 1994.
- CHAVES, J.Q.; PIRES, E.S.; VIVONI, A.M. Genetic diversity, antimicrobial resistance and toxigenic profiles of *Bacillus cereus* isolated from food in Brazil over three decades. **International Journal of Food Microbiology**, v.147, n.1, p.12-16, 2011.
- CHEN, L.; COOLBEAR, T.; DANIEL, R.M. Characteristics of proteinases and lipases produced by seven *Bacillus* sp. isolated from milk powder production lines. **International Dairy Journal**, v.14, n.6, p.495-504, 2004.
- CHEN, L.; DANIEL, R.M.; COOLBEAR, T. Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. **International Dairy Journal**, v.13, n.4, p.255-275, 2003.
- CHOMA, C.; GRANUM, P.E. The enterotoxin T (BcET) from *Bacillus cereus* can probably not contribute to food poisoning. **FEMS Microbiology Letters**, v.217, n.1, p.115-119, 2002.
- CHOUDHERY, A.K.; MIKOLAJCIK, E.M. Activity of *Bacillus cereus* proteinases in milk. **Journal of Dairy Science**, v.53, n.3, p.363-366, 1970.
- CHRISTIANSSON, A. *Bacillus cereus*. In: ROGINSKI, H.; FUQUAY, J.; FOX, P. (Eds.) **Encyclopedia of Dairy Sciences**. Academic Press, Maryland, EUA, 2002, p.123-128.
- CHRISTIANSSON, A.; BERTILSSON, J.; SVENSSON B. *Bacillus cereus* spores in raw milk: Factors affecting the contamination of milk during the grazing period. **Journal of Dairy Science**, v.82, n.2, p.305-314, 1999.

- COLLINS, E.B. Heat resistant psychrotrophic microorganisms. **Journal of Dairy Science**, v.64, n.1, p.157-160, 1981.
- CORNELL. **Disease Outbreaks Associated with Milk Products**. The Milk Quality Improvement Program, Department of Food Science, Cornell University, Ithaca, EUA, 2010. Disponível em: <http://www.milkfacts.info/Milk%20Microbiology/Disease%20Outbreaks.htm>. Acesso em: 15 mar. 2011.
- COUSIN, M.A. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: a review. **Journal of Food Protection**, v.45, n.2, p.172-207, 1982.
- CRONIN, U.P.; WILKINSON, M.G. *Bacillus cereus* endospores exhibit a heterogeneous response to heat treatment and low-temperature storage. **Food Microbiology**, v.25, n.2, p.235-243, 2008.
- DE JONGHE, V.; COOREVITS, A.; DE BLOCK, J.; COILLE, E.V.; GRIJSPEERDT, K.; HERMAN, L.; DE VOS, P.; HEYNDRICKX, M. Toxigenic and spoilage potential aerobic spore-formers isolated from raw milk. **International Journal of Food Microbiology**, v.136, n.3, p.318-325, 2010.
- DIDELOT, X.; BARKER, M.; FALUSH, D.; PRIEST, F.G. Evolution of pathogenicity in the *Bacillus cereus* group. **Systematic and Applied Microbiology**, v.32, n.2, p.81-90, 2009.
- DROBNIIEWSKI, F.A. *Bacillus cereus* and related species. **Clinical Microbiology Reviews**, v.6, n.4, p.324-338, 1993.
- DUFRENNE, J.; BIJWAARD, M.; GIFFEL, M.; BEUMER, R.; NOTERMANS, S. Characteristics of some psychrotrophic *Bacillus cereus* isolates. **International Journal of Food Microbiology**, v.27, n.2, p.175-183, 1995.
- ENEROTH, A.; CHRISTIANSSON, A.; BRENDENHAUG, J.; MOLIN, G. Critical contamination sites in the production line of pasteurized milk, with reference to

the psychrotrophic spoilage flora. **International Dairy Journal**, v.8, n.9, p.829-834, 1998.

ERCOLINI, D.; RUSSO, F.; FERROCINO, I.; VILLANI, F. Molecular identification of mesophilic and psychrotrophic bacteria from raw cow's milk. **Food Microbiology**, v.26, n.2, p.228-231, 2009.

ERLICH, H.A.; GELFAND, D.; SNINSKY, J.J. Recent advances in the polymerase chain reaction. **Science**, v.252, n.5013, p.1643-1651, 1991.

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

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

FERMANIAN, C.; LAPEYRE, C.; FREMY, J.M.; CLAISSE, M. Diarrhoeal toxin production at low temperature by selected strains of *Bacillus cereus*. **Journal of Dairy Research**, v.64, n.4, p.551-559, 1997.

FINLAY, W.J.J.; LOGAN, N.A.; SUTHERLAND, A.D. *Bacillus cereus* produces most emetic toxin at lower temperatures. **Letters in Applied Microbiology**, v.31, n.5, p.385-389, 2000.

FOEGEDING, P.M.; BERRY, E.D. Cold temperature growth of clinical and food isolated of *Bacillus cereus*. **Journal of Food Protection**, v.60, n.10, p.1256-1258, 1997.

FRANCIS, K.P.; MAYR, R.; STETTEN, F.; STEWART, G.S.A.B.; SCHERER, S. Discrimination of psychrotrophic and mesophilic strains of the *Bacillus cereus* group by PCR targeting of major cold shock protein genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, n.9, p.3525-3529, 1998.

- FROMM, H.I.; BOOR, K.J. Characterization of pasteurized fluid milk shelf-life attributes. **Journal of Food Science**, v.69, n.8, p.207-214, 2004.
- FURTADO, M.M. **Principais problemas dos queijos: causas e prevenção**. Fonte Comunicações e Editora, São Paulo, Brasil, 200p., 2005.
- GAILLARD, S.; LEGUERINEL, I.; MAFART, P. Model for combined effects of temperature, pH and water activity on thermal inactivation of *Bacillus cereus* spores. **Journal of Food Science**, v.63, n.5, p.887-889, 1998.
- GANDRA, E.A.; GANDRA, T.K.V.; MELLO, W.S.; GODOI, H.S. Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. **Acta Scientiarum. Technology**, v.30, n.1, p.109-118, 2008.
- GARCÍA-ARMESTO, M.R.; SUTHERLAND, A.D. Temperature characterization of psychrotrophic and mesophilic *Bacillus* species from milk. **Journal of Dairy Research**, v.64, n.2, p.261-270, 1997.
- GIFFEL, M.C.; BEUMER, R.R.; LANGEVELD, L.P.M.; ROMBOOTS, F.M. The role of heat exchangers in the contamination of milk with *Bacillus cereus* in dairy processing plants. **International Journal of Dairy Technology**, v.50, n.2, p.43-47, 1997.
- GRANUM, P.E. *Bacillus cereus* and Food Poisoning. In: BERKELEY, R.; HEYNDRIKX, M.; LOGAN, N.; DE VOS, P. (Eds.). **Applications and Systematics of Bacillus and Relatives**. Blackwell Publishing, Oxford, UK, 2002, p.39-46.
- GRANUM, P.E.; BRYNESTAD, S.; KRAMER, J.M. Analysis of enterotoxin production by *Bacillus cereus* in dairy products, food poisoning incidents and non-gastrointestinal infections. **International Journal of Food Microbiology**, v.17, n.4, p.269-279, 1993.
- GUINEBRETIERE, M.H.; THOMPSON, F.L.; SOROKIN, A.; NORMAND, P.; DAWYNDT, P.; EHLING-SCHULZ, M.; SVENSSON, B.; SANCHIS, V.,

- NGUYEN-THE, C.; HEYNDRICKX, M.; DE VOS, P. Ecological diversification in the *Bacillus cereus* group. **Environmental Microbiology**, v.10, n.4, p. 851-865, 2008.
- HENDRIKSEN, N.B; HANSEN, B.M.; JOHANSEN, J.E. Occurrence and pathogenic potential of *Bacillus cereus* group bacteria in a sandy loam. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.89, n.2, p.239-249, 2006.
- JANSTOVÁ, B.; DRACKOVÁ, M., VORLOVÁ, L. Effect of *Bacillus cereus* enzymes on the milk quality following ultra-high temperature processing. **Acta Veterinaria Brno**, v.75, n.4, p.601-609, 2006.
- JENSEN, G.B.; HANSEN, B.M.; EILENBERG, J.; MAHILLON, J. The hidden lifestyles of *Bacillus cereus* and relatives. **Environmental Microbiology**, v.5, n.8, p.631-640, 2003.
- KAPS, M.; LAMBERSON, W.R. **Biostatistics for animal science**. Cab International, Oxfordshire, Inglaterra, 487p., 2009.
- KOHLMANN, K.L.; NIELSEN, S.S.; STEENSON, L.R.; LADISCH, M.R. Production of proteases by psychotrophic microorganisms. **Journal of Dairy Science**, v.74, n.10, p.3275-3283, 1991.
- KRAMER, J.M.; GILBERT, R.J. *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. In: DOYLE, M.P. (Ed.). **Food Born Bacterial Pathogens**. Marcel Dekker, New York, EUA, 1989, p.21-70.
- LARSEN, H.D.; JORGENSEN, K. Growth of *Bacillus cereus* in pasteurized milk products. **International Journal of Food Microbiology**, v.46, n.2, p.173-176, 1999.
- LARSEN, H.D.; JORGENSEN, K. The occurrence of *Bacillus cereus* in Danish pasteurized milk. **International Journal of Food Microbiology**, v.34, n.2, p.179-186, 1997.

- LAW, B.A. Enzymes of psychrotrophic bacteria and their effects on milk and milk products. **Journal of Dairy Research**, v.46, n. 3, p.573-588, 1979.
- LECHNER, S.; MAYR, R.; FRANCIS, K.P.; PRUB, B.M.; KAPLAN, T.; WIEBNER-GUNKEL, E.; STEWART, G.S.A.B.; SCERER, S. *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.48, n.4, p.1373-1382, 1998.
- LIN, S.; SHRAFT, H.; ODUMERU, J.A.; GRIFFITHS, M.W. Identification of contamination sources of *Bacillus cereus* in pasteurized milk. **International Journal of Food Microbiology**, v.43, n.3, p.159-171, 1998.
- LUND, T.; GRANUM, P.E. Comparison of biological effect of the two different enterotoxin complexes isolated from three different strains of *Bacillus cereus*. **Microbiology**, v.143, n.10, p.3329-3336, 1997.
- MAGNUSSON, M.; CHRISTIANSSON, A.; SVENSSON, B. *Bacillus cereus* spores during housing of dairy cows: factors affecting contamination of raw milk. **Journal of Dairy Science**, v.90, n.6, p.2745-2754, 2007.
- MALORNY, B.; TASSIONS, P.T.; RADSTRÖM, P.; COOK, N.; WAGNER, M.; HOORFAR, J. Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, v.83, n.1, p.39-48, 2003.
- MARTÍNEZ-BLANCH, J.F.; SÁNCHEZ, G.; AZNAR, R. Development of a real-time PCR assay for detection and quantification of enterotoxigenic members of *Bacillus cereus* group in food samples. **International Journal of Food Microbiology**, v.135, n.1, p.15-21, 2009.
- MARTINS, M.L.; PINTO, C.L.O.; ROCHA, R.B.; ARAUJO, E.F.; VANETTI, M.C.D. Genetic diversity of gram-negative, proteolytic, psychrotrophic bacteria isolated

- from refrigerated raw milk. **International Journal of Food Microbiology**, v.111, n.2, p.144-148, 2006.
- MATTA, H.; PUNJ, V. Isolation and identification of lipolytic, psychrotrophic, spore-forming bacteria from raw milk. **International Journal of Dairy Technology**, v.52, n.2, p.59-62, 1999.
- MATTOS, M.R.; BELOTTI, V.; TAMANINI, R.; MAGNANI, D.F.; NERO, L.A.; BARROS, M.A.F.; PIRES, E.M.F.; PAQUEREAU, B.P.D. Qualidade do leite cru produzido na região agreste de Pernambuco, Brasil. **Semina – Ciências Agrárias**, v.31, n.1, p.173-182, 2010.
- MAYR, B.; KAPLAN, T.; LECHNER, S.; SCHERER, S. Identification and purification of a family of dimeric major cold shock protein homologs from the psychrotrophic *Bacillus cereus* WSBC 10201. **Journal of Bacteriology**, v.178, n.10, p.2916-2925, 1996.
- MAZAS, M.; MARTINEZ, S.; LOPEZ, M.; ALVAREZ, A.B.; MARTIN, R. Thermal inactivation of *Bacillus cereus* spores affected by solutes used to control water activity of the heating medium. **International Journal of Food Microbiology**, v.53, n.1, p.61-67, 1999.
- MCCARTHY, O.J.; SINGH, H. Physico-chemical properties of milk. In: McSWEENEY, P.L.H.; FOX, P. (Eds.). **Advanced Dairy Chemistry: Volume 3**. Springer Science, New York, EUA, 2009, p.691-758.
- McPHEE, J.D.; GRIFFITHS, M.W. Psychrotrophic bacteria: *Pseudomonas* spp. In: FUQUAY, J.F. (Ed.). **Encyclopedia of Dairy Sciences**. 2^a Ed. Guelph University, Guelph, Canadá, 2011, p.379-383.
- MEER, R.R.; BAKER, J.; BODYFELT F.W.; GRIFFITHS, M.W. Psychrotrophic *Bacillus* spp. in fluid milk products: a review. **Journal of Food Protection**, v.54, n.12, p.969-979, 1991.

- MIGUEL, E.M.; TEODORO, V.A.M.; AHASHIRO, E.K.N. Micro-organismos psicrótróficos em leite. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.62, n.355, p.38-41, 2007.
- MITCHELL, G.E.; EWINGS, K.N. Physicochemical properties of proteinases from selected psychrotrophic bacteria. **Journal of Dairy Research**, v.53, n.1, p.97-115, 1986.
- MOREIRA, M.; NOSCHANG, J.; NEIVA, I.F.; CARVALHO, Y.; HIGUTI, I.H.; VICENTE, V.A. Methodological variations in the isolation of genomic from *Streptococcus* bacteria. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v.53, n.4, p.845-849, 2010.
- MOSSEL, D.A.A.; KOOPMAN, M.J.; JONGERIUS, E. Enumeration of *Bacillus cereus* in foods. **Applied Microbiology**, v.15, n.3, p.650-653, 1967.
- MUIR, D.D. The shelf life of dairy products: factors influencing raw milk and fresh products. **Journal of the Society of Dairy Technology**, v.49, n.1, p.24-32, 1996.
- MURUGAN, B.; VILLI, R.A. Proteolytic activity of *Bacillus* species isolated from milk and dairy products. **Tamilnadu Journal Veterinary & Animal Sciences**, v.5, n.2, p.47-50, 2009.
- NADA, S.; ILLIJA, D.; IGOR, T.; JELENA, M.; RUZICA, G. Implication of food safety measures on microbiological quality of raw and pasteurized milk. **Food Control**, v.25, n.2, p.728-731, 2012.
- NASCIMENTO, M.S.; SOUZA, P.A. Estudo da correlação linear entre a contagem padrão em placa, a contagem de psicrótróficos e a prova de redutase em leite cru refrigerado. **Higiene Alimentar**, v.16, n.97, p.81-86, 2002.
- NERO, L.A.; MATTOS, M.R.; BELOTI, V.; BARROS, M.A.F.; PINTO, J.P.A.N.; ANDRADE, N.J.; SILVA, W.P.; FRANCO, B.D.G.M. Leite cru de quatro regiões leiteiras brasileiras: perspectivas de atendimento dos requisitos microbiológicos

- estabelecidos pela Instrução Normativa 51. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.51, n.1, p.191-195, 2005.
- NIELSEN, S.S. Plasmin system and microbial proteases in milk: characteristics, roles, and relationship. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, n.22, p.6628-6634, 2002.
- NÖRNBERG, M.F.B.L.; FRIEDRICH, R.S.C.; WEISS, R.D.N.; TONDO, E.C.; BRANDELLI, A. Proteolytic activity among psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk. **International Journal of Dairy Technology**, v.63, n.1, p. 41-46, 2010.
- NÖRNBERG, M.F.B.L.; TONDO, E.C.; BRANDELLI, A. Bactérias psicotróficas e atividade proteolítica no leite cru refrigerado. **Acta Scientia Veterinaria**, v.37, n.2, p.157-163, 2009.
- NOTERMANS, S.; DUFRENNE, J.; TEUNIS, P.; BEUMER, R.; GIFFEL, M.; WEEM, P.P. A risk assessment study of *Bacillus cereus* present in pasteurized milk. **Food Microbiology**, v.14, n.2, p.143-151, 1997.
- PICARD, C.; PLARD, I.; RONGDAUX-GAIDA, D.; COLLIN, J.C. Detection of proteolysis in raw milk stored at low temperature by an inhibition ELISA. **Journal of Dairy Research**, v.61, n.3, p.395-404, 1994.
- PINTO, C.J.O.; MARTINS, M.L.; VANETTI, M.C.D. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicotróficas proteolíticas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.3, p.645-651, 2006.
- PLANCHON, S.; DARGAIGNARATZ, C.; LEVY, C.; GINIES, C.; BROUSSOLLE, V.; CARLIN, F. Spores of *Bacillus cereus* strain KBAB4 produced at 10 °C and 30 °C display variations in their properties. **Food Microbiology**, v.28, n.2, p.291-297, 2011.

- POSTOLLEC, F.; FALENTIN, H.; PAVAN, S.; COMBRISSE, J.; SOHIER, D. Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology. **Food Microbiology**, v.28, n.5, p.848-86, 2011.
- PRIEST, F.G.; BARKER, M.; BAILLIE, L.W.J.; HOLMES, E.C.; MAIDEN, M.C.J. Population structure and evolution of the *Bacillus cereus* group. **Journal of Bacteriology**, v.186, n.23, p.7959-7970, 2004.
- QUIGLEY, L.; O'SULLIVAN, O.; BERESFORD, T.P.; ROSS, R.P.; FITZGERALD, G. F.; COTTER, P.D. Molecular approaches to analyzing the microbial composition of raw milk and raw milk cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v.150, n.2-3, p.81-94, 2011.
- RAATS, D.; OFFEK, M.; MINZ, D.; HALPERN, M. Molecular analysis of bacterial communities in raw cow milk and the impact of refrigeration on its structure and dynamics. **Food Microbiology**, v.28, n.3, p.465-471, 2011.
- RAJKOWSKI, K.T.; BENNET, R.W. *Bacillus cereus*. In: MILIOTIS, M.D.; BIER, J.W. **International Handbook of Foodborne Pathogens**. Marcel Dekker, New York, EUA, 2003, p.27-40.
- REYES, J.E.; BASTIAS, J.M.; GUTIERREZ M.R.; RODRIGUES, M.O. Prevalence of *Bacillus cereus* in dried milk products used by Chilean school feeding program. **Food Microbiology**, v.24, n.1, p.1-6, 2007.
- REZENDE-LAGO, N.C.M.; ROSSI, O.D.; VIDAL-MARTINS A.M.C.; AMARAL L.A. Occurrence of *Bacillus cereus* in whole milk and enterotoxigenic potential of the isolated strains. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.6, p.1563-1569, 2007.
- RHODEHAMEL, E.J.; HARMON, S.M. *Bacillus cereus*. In: HAMMACK, T.; FENG, P.; JINNEMAN, K.; REGAN, P.M.; KASE, J.; ORLANDI, P.; BURKHARDT, W. (Eds.). **Bacteriological Analytical Manual**. 8^a Ed. Food and Drug

Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition, Washington DC, EUA, 1998, cap.14.

ROSA, L.S.; QUEIROZ, M.I. Avaliação da qualidade do leite cru e resfriado mediante a aplicação de princípios do APPCC. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, n.2, p.422-430, 2007.

RUKURE, G.; BESTER, B.H. Survival and growth of *Bacillus cereus* during Gouda cheese manufacturing. **Food Control**, v.12, n.1, p.31-36, 2001.

SALUSTIANO, V.C.; ANDRADE, N.J.; SOARES, N.F.F.; LIMA, J.C.; BERNARDES, L.M.P.; FERNANDES, P.E. Contamination of milk with *Bacillus cereus* by port-pasteurization surface exposure as evaluated by automated ribotyping. **Food Control**, v.20, n.4, p.439-442, 2009.

SANTANA, E.H.W.; BELOTI, V.; BARROS, M.A.F.; MORAES, L.B.; GUSMÃO, V.V.; PEREIRA, M.S. Contaminação do leite em diferentes pontos do processo de produção: microrganismos aeróbios mesófilos e psicrotróficos. **Semina: Ciências Agrárias**, v.22, n.2, p.145-154, 2001.

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

SCHRAFT, H.; STEELE, M.; McNAB, B.; ODUMERU, J.; GRIFFITHS, M.W. Epidemiological typing of *Bacillus* spp. isolated from food. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, n.11, p.4229-4232, 1996.

SENESI, S.; GHELARDI, E. Production, secretion and biological activity of *Bacillus cereus* enterotoxins. **Toxins**, v.2, n.7, p.1690-1703, 2010.

SERRA, M.J.B. Qualidade microbiana e físico-química do leite cru produzido na região de Pardinho, SP. **Dissertação de Mestrado** (Mestrado em Medicina Veterinária), Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, 2004.

- SETTANNI, L.; CORSETTI, A. The use of multiplex PCR to detect and differentiate food and beverage-associated microorganisms: a review. **Journal of Microbiological Methods**, v.69, n.1, p.1-22, 2007.
- SGARBIERI, V.C. Revisão: propriedades estruturais e físico-químicas das proteínas do leite. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.8, n.1, p.43-56, 2005.
- SHAHEEN, R.; SVENSSON, B.; ANDERSON, M.A.; CHRISTIANSSON, A.; SALKINOJA-SALONEN, M. Persistence strategies of *Bacillus cereus* spores isolated from dairy silo tanks. **Food Microbiology**, v.27, n.3, p.347-355, 2010.
- SHEHATA, T.E.; COLLINS, E.B. Isolation and identification of psychrophilic species of *Bacillus* from milk. **Applied Environmental Microbiology**, v.21, n.3, p.466-469, 1971.
- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A.; TNIWAKI, M.H.; SANTOS, R.F.S.; GOMES, R.A.R. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água**. Editora Livraria Varela, São Paulo, Brasil, 624p., 2010.
- SILVA, P.H.F. **Leite UHT: fatores determinantes para sedimentação e gelificação**. Oficina de Impressão Gráficas e Editora Ltda., Juiz de Fora, Brasil, 127p., 2004.
- SILVEIRA, I.A.; CARVALHO, E.P.; TEIXEIRA, D. Influência de microrganismos psicrotróficos sobre a qualidade do leite refrigerado: uma revisão. **Higiene Alimentar**, v.12, n.55, p.21-27, 1998.
- SIMEPAR. **Caracterização do clima da região Sul do Brasil e do Paraná**. Instituto Tecnológico do Sistema Meteorológico do Paraná, SIMEPAR, Curitiba, Brasil. 2011. Disponível em: http://www.simepar.br/internas/conteudo/ produtos_servicos/pesquisa.html. Acesso em: 15 dez. 2011.
- SORHAUG, T.; STEPANIAK, L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: quality aspects. **Trends of Food Science and Technology**, v.8, n.2, p.35-41, 1997.

- STADHOUDERS, J. Taxonomy of *Bacillus cereus*. **Bulletin of International Dairy Federation**, v.275, p.4-8, 1992.
- STATSOFT. **Statistica v.8.0**. StatSoft Inc., Tulsa, EUA, 2009. Disponível em: http://www.statsoft.com.br/pt/downloads_controle.php?id=93. Acesso em: 14 out. 2009.
- STEAD, D. Microbial lipases: their characteristics, role in food spoilage and industrial uses. **Journal of Dairy Research**, v.53, n.3, p.481-505, 1986.
- STENFORS, L.P; GRANUM, P.E. Psychrotolerant species from the *Bacillus cereus* group are not necessarily *Bacillus weihenstephanensis*. **FEMS Microbiology Letters**, v.197, n.2, p.223-228, 2001.
- STEPANIAK, L. Factors affecting quality and possibilities of predicting shelf life of pasteurized an ultra-high temperature heated milk. **Italian Journal of Food Science**, v.4, p.11-26, 1991.
- STETTEN, F.; FRANCIS, K.P.; LECHNER, S.; NEUHAUS, K.; SCHERER, S. Rapid discrimination of psychrotolerant and mesophilic strains of the *Bacillus cereus* group by PCR targeting of 16S rDNA. **Journal of Microbiological Methods**, v.34, n.2, p.99-106, 1998.
- STETTEN, F.; MAYR, R.; SCHERER, S. Climatic influence on mesophilic *Bacillus cereus* and psychrotolerant *Bacillus weihenstephanensis* populations in tropical, temperate and alpine soil. **Environmental Microbiology**, v.1, n.6, p.503-515, 1999.
- SVENSSON, B.; EKELUND, K.; OGURA, H.; CHRISTIANSSON, A. Characterization of *Bacillus cereus* isolated from milk silo tanks at eight different dairy plants. **International Dairy Journal**, v.14, n.1, p.17-27, 2004.
- SVENSSON, B.; ENEROTH, A.; BRENDHAUG, J.; CHRISTIANSSON, A. Investigation of *Bacillus cereus* contamination sites in a dairy plant with RAPD-PCR. **International Dairy Journal**, v.9, n.12, p.903-912, 1999.

- SVENSSON, B.; MONTHÁN, A.; GUINEBRETIERE, M.H.; NGUYEN-THÉ, C.; CHRISTIANSSON, A. Toxin production potential and detection of toxin genes among strains of the *Bacillus cereus* group isolated along the dairy production chain. **International Dairy Journal**, v.17, n.10, p.1201-1208, 2007.
- TULLIO, L.T. Isolamento e caracterização do glicomacropéptido de soro de leite. **Dissertação de Mestrado** (Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2007.
- VAISANEN, O.M.; MWAISUMO, N.J.; SALKINOJA-SALONEN, M.S. Differentiation of dairy strains of the *Bacillus cereus* group by phage typing, minimum growth temperature and fatty acid analysis. **Journal of Applied Microbiology**, v.70, n.4, p.315-324, 1991.
- VALÍK, L.; GÖNER, F.; LAUKOVA, D. Growth dynamics of *Bacillus cereus* and shelf life of pasteurised milk. **Czech Journal of Food Sciences**, v.21, n.6, p.195-202, 2003.
- VIDAL-MARTINS, A.A.; ROSSI JR., O.D.; REZENDE-LAGO, N.C. Mesophilic heterotrophic microorganisms and spore forming bacteria from *Bacillus cereus* group in ultra-high temperature milk. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.3, p.396-400, 2005.
- VISSERS, M.M.M.; TE GIFFEL, M.C.; DRIEHUIS, F.; DE JONG, P.; LANKVELD, J.M.G. Minimizing the level of *Bacillus cereus* spores in farm tank milk. **Journal of Dairy Science**, v.90, n.7, p.3286-3293, 2007.
- WANG, L.; JAYARAO, B.M. Phenotypic and genotypic characterization of *Pseudomonas fluorescens* isolated from bulk tank milk. **Journal of Dairy Science**, v.84, n.6, p.1421-1229, 2001.
- WATANUKI, M.M.; GALLO, C.R. Detecção de *Bacillus cereus* em leite e avaliação da germinação dos esporos após tratamento térmico. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.67, n.3, p.202-207, 2008.

- WIJNANDS, L.M.; DUFRENNE, J.B.; VAN LEUSDEN, F.M. **Characterization of *Bacillus cereus***. Dutch National Institute for Public Health and the Environment, Bilthoven, Holanda, 2002. Disponível em: <http://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/250912002.pdf>. Acesso em: 28 out. 2009.
- WIJNANDS, L.M.; DUFRENNE, J.B.; ZWIETERING, M.H.; VAN LEUSDEN, F.M. Spores from mesophilic *Bacillus cereus* strains germinate better and grow faster in simulated gastro-intestinal conditions than spores from psychrotrophic strains. **International Journal of Food Microbiology**, v.112, n.2, p.120-128, 2006.
- WONG, H.C.; CHANG, M.H.; FAN, J.Y. Incidence and characterization of *Bacillus cereus* isolates contaminating dairy products. **Applied Environmental Microbiology**, v.54, n.3, p.699-702, 1988.
- YUAN, D.D.; LIU, G.C.; REN, D.Y.; ZHANG, D.; ZHAO, L.; KAN, C.P.; YANG Y.Z.; MA, W.; LI, Y.; ZHANG, L.B. A survey on occurrence of thermophilic bacilli in commercial milk powders in China. **Food Control**, v.25, n.2, p.752-757, 2012.
- ZANELA, M.B.; FISCHER, V.; RIBEIRO, M.E.R.; STUMPF J.R.; ZANELA, C.; MARQUES, L.T.; MARTINS, P.R.G. Qualidade do leite em sistemas de produção na região Sul do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.1, p.153-159, 2006.
- ZHOU, G.; LIU, H.; HE, J.; YUAN, Y.; YUAN, Z. The occurrence of *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis* and *B. mycooides* in Chinese pasteurized full fat milk. **International Journal of Food Microbiology**, v.121, n.2, p.195-200, 2008.
- ZHOU, G.; ZHENG, D.; DOU, L.; CAI, Q.; YUAN, Z. Occurrence of psychrotolerant *Bacillus cereus* group strains in ice creams. **International Journal of Food Microbiology**, v.137, n.2, p.143-146, 2010.

ANEXO

Resultados fenotípicos e genotípicos de estirpes de *B. cereus sensu stricto* isoladas em produtos lácteos, de acordo com a atividade psicrotrofica.

Amostra	Fenótipo		Genótipo	
	Multiplicação a 7 °C / 10 dias	Multiplicação a 10 °C / 7 dias	Gene <i>cspA</i>	16S rDNA
LPO01	Negativo	Positivo	Negativo	M/P
LPO05	Negativo	Positivo	Positivo	M/P
LPO09	Negativo	Positivo	Negativo	M
LPO12	Negativo	Positivo	Negativo	M
LPO21	Negativo	Positivo	Negativo	M/P
LPO22	Negativo	Positivo	Positivo	M/P
LPO26	Negativo	Negativo	Positivo	M/P
LPO29	Negativo	Positivo	Positivo	M/P
LPO30	Negativo	Positivo	Negativo	M
LPO37	Negativo	Positivo	Negativo	M/P
LPO39	Negativo	Positivo	Negativo	M
LPO40	Negativo	Positivo	Negativo	M/P
LPO41	Negativo	Positivo	Negativo	M/P
LPO42	Negativo	Positivo	Negativo	M/P
LPO43	Negativo	Positivo	Positivo	M/P
UHT29	Negativo	Positivo	Positivo	M/P
UHT37	Negativo	Positivo	Negativo	M/P
UHT38	Negativo	Negativo	Negativo	M/P
UHT43	Negativo	Negativo	Negativo	M/P
UHT44	Negativo	Negativo	Negativo	M
UHT47	Negativo	Positivo	Negativo	M/P
UHT48	Negativo	Negativo	Negativo	M/P
UHT50	Negativo	Negativo	Positivo	M/P
UHT52	Negativo	Positivo	Negativo	M/P
UHT53	Negativo	Negativo	Negativo	M/P
UHT55	Negativo	Positivo	Negativo	M
UHT65	Negativo	Negativo	Negativo	M/P
LP03	Negativo	Negativo	Negativo	M
LP09	Negativo	Positivo	Negativo	M
LP11	Negativo	Positivo	Positivo	M/P
LP12	Negativo	Positivo	Negativo	M/P
LP14	Negativo	Positivo	Positivo	M/P
LP18	Negativo	Positivo	Negativo	M/P

LP21	Negativo	Positivo	Positivo	M/P
LP26	Negativo	Positivo	Positivo	M/P
LP28	Negativo	Positivo	Positivo	M/P
LP30	Negativo	Positivo	Positivo	M/P
LP32	Negativo	Positivo	Negativo	M
LP34a	Negativo	Positivo	Positivo	M/P
LP34b	Negativo	Positivo	Positivo	M/P
LP35	Negativo	Positivo	Positivo	M/P
LP40a	Negativo	Positivo	Negativo	M
LP40b	Negativo	Positivo	Positivo	M/P
LP41	Negativo	Positivo	Negativo	M
LP42a	Negativo	Positivo	Negativo	M
LP42b	Negativo	Positivo	Negativo	M/P
LP43	Negativo	Positivo	Negativo	M
LP45	Negativo	Positivo	Positivo	M
LP46a	Negativo	Positivo	Negativo	M
LP46b	Negativo	Positivo	Positivo	M/P
LP47	Negativo	Positivo	Positivo	P
LP49	Negativo	Positivo	Negativo	M
LP51	Negativo	Positivo	Positivo	M
LP52	Negativo	Positivo	Negativo	M
LP56	Negativo	Positivo	Positivo	M/P
LP59	Negativo	Positivo	Negativo	M
LP60	Negativo	Positivo	Negativo	M
LP66	Negativo	Positivo	Negativo	M
LP85a	Negativo	Positivo	Positivo	M/P
LP85b	Negativo	Positivo	Positivo	M/P
LP89	Negativo	Positivo	Negativo	M
LP92	Negativo	Positivo	Negativo	M
LP94	Negativo	Positivo	Positivo	M
Total	63	54	25	

LPO: estirpes isoladas em leite em pó; UHT: estirpes isoladas em leite UHT; LP: estirpes isoladas em leite pasteurizado;
M: Mesófilo; P: Psicrotófico.