

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

***Bacillus cereus*: PRODUÇÃO DE METALLOPROTEINASES  
NA CADEIA PRODUTIVA DE LÁCTEOS E AVALIAÇÃO DA  
PROTEÓLISE DA KAPPA-CASEÍNA EM LEITE  
PASTEURIZADO**

**Carlos Eduardo Gamero Aguilar**

Médico Veterinário

2018

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

***Bacillus cereus*: PRODUÇÃO DE METALLOPROTEINASES  
NA CADEIA PRODUTIVA DE LÁCTEOS E AVALIAÇÃO DA  
PROTEÓLISE DA KAPPA-CASEÍNA EM LEITE  
PASTEURIZADO**

**Carlos Eduardo Gamero Aguilar**

**Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria Centola Vidal**

**Coorientador: Prof. Dr. Heidge Fukumasu**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária (Medicina Veterinária Preventiva)

**2018**

A283b Aguilar, Carlos Eduardo Gamero  
*Bacillus cereus*: produção de metaloproteinases na cadeia produtiva de lácteos e avaliação da proteólise da kappa-caseína em leite pasteurizado / Carlos Eduardo Gamero Aguilar. -- Jaboticabal, 2018  
iv, 63 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2018

Orientador: Ana Maria Centola Vidal

Banca examinadora: Rachel Zoccal Saba, Karina Paes Bürger, Raimundo Nonato Rabelo, Andrezza Maria Fernandes

Bibliografia

1. Biologia molecular. 2. Leite-microbiologia. 3. Sequenciamento genômico. 4. Deterioração proteica I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:637.143.3

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

TÍTULO DA TESE: *Bacillus cereus*: PRODUÇÃO DE METALLOPROTEINASES NA CADEIA PRODUTIVA DE LÁCTEOS E AVALIAÇÃO DA PROTEÓLISE DA KAPPA-CASEÍNA EM LEITE PASTEURIZADO

**AUTOR: CARLOS EDUARDO GAMERO AGUILAR**

**ORIENTADORA: ANA MARIA CENTOLA VIDAL**

**COORDENADOR: HEIDGE FUKUMASU**

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em MEDICINA VETERINÁRIA, área: MEDICINA VETERINARIA PREVENTIVA pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. ANA MARIA CENTOLA VIDAL  
Departamento de Medicina Veterinária / FZEA / USP - Pirassununga/SP




Profa. Dra. ANDREZZA MARIA FERNANDES  
Departamento de Medicina Veterinária / FZEA / Pirassununga / SP



Profa. Dra. KARINA PAES BÜRGER  
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Prof. Dr. RAIMUNDO NONATO RABELO  
Universidade de Franca / UNIFRAN



Profa. Dra. RACHEL ZOCCAL SABA  
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP / Jaboticabal

Jaboticabal, 04 de maio de 2018

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**Carlos Eduardo Gamero Aguilar** – natural de Ribeirão Preto, São Paulo, ingressou no curso de graduação em Medicina Veterinária da FCAV/Unesp/Câmpus de Jaboticabal, no ano de 2006. Durante a graduação, pertenceu ao Programa de Educação Tutorial do curso de Medicina Veterinária e foi bolsista de Iniciação Científica pela FAPESP. De 2010 a 2012, trabalhou em grandes laticínios brasileiros na área de qualidade de campo e corporativa. Ingressou no curso de mestrado no ano de 2012, sob orientação do Prof. Dr. Oswaldo Durival Rossi Junior, obtendo o título de mestre em Medicina Veterinária (Medicina Veterinária Preventiva) pela mesma instituição em 2014. No mesmo ano adentrou ao curso de doutorado, da mesma instituição sob orientação da Profa. Dra. Ana Maria Centola Vidal da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, Pirassununga. Possui experiência nas áreas de segurança dos alimentos, higiene e inspeção sanitária de alimentos, tecnologia e microbiologia de alimentos.

## AGRADECIMENTOS

À Deus pela saúde e oportunidade de estudo a qual me foi dada.

A minha esposa Bruna Reis Aguilar, pelo amor, incentivo e principalmente compreensão nestes anos que ficamos distantes.

Aos meus pais, Antônio Gomes e Cláudia Gamero, por me proporcionarem uma educação de qualidade, sem os quais não teria alcançado meus objetivos.

Ao meu irmão, pelo exemplo a ser seguido de inteligência e dedicação.

À minha orientadora, Profa. Dra. Ana Maria Centola Vidal pelo profissionalismo, conselhos e ética repassados ao longo dos anos de convívio, sem os quais, o desafio aceito nunca teria sido bem-sucedido.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Heidge Fukumasu, pela paciência nos ensinamentos e repasse de conhecimento.

Aos amigos que optaram por trilhar o mesmo caminho, sem os quais a vida fica menos feliz – Higor, Gabriel, Joyce, Ana Carolina, Ana Paula e Laryssa.

Aos irmãos da República Agrotóxico, pela amizade e companheirismo durante todos estes anos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento à execução do projeto de pesquisa (processo 2015/20874-0).

Aos professores e funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP.

À UNESP e aos funcionários do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária Preventiva,

À Arina, pelos ensinamentos e amizade sem os quais o projeto não teria sido concluído com êxito.

Aos técnicos, colegas e funcionários da FZEA/USP, Pirassununga, pela atenção disponibilizada.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
<b>CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....</b>	<b>1</b>
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
REFERÊNCIAS.....	13
<b>CAPÍTULO 2 – CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE METALLOPROTEINASES SINTETIZADAS POR <i>Bacillus cereus</i> s.s. ISOLADOS AO LONGO DA CADEIA PRODUTIVA DO LEITE E DERIVADOS LÁCTEOS.....</b>	<b>23</b>
RESUMO.....	23
1. INTRODUÇÃO.....	24
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
2.1. Obtenção das amostras.....	26
2.2. Isolamento bacteriano e testes bioquímicos.....	26
2.3. Caracterização fenotípica da atividade proteolítica.....	27
2.4. Caracterização fenotípica de cepas psicotróficas.....	27
2.5. Caracterização genotípica da atividade proteolítica e psicotrófica.....	27
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
4. CONCLUSÃO.....	34
AGRADECIMENTOS.....	34
REFERÊNCIAS.....	35
<b>CAPÍTULO 3 – AVALIAÇÃO DA PROTEÓLISE DA KAPPA-CASEÍNA AO LONGO DO TEMPO DE PRATELEIRA DE LEITE PASTEURIZADO CONTAMINADO EXPERIMENTALMENTE COM <i>Bacillus cereus sensu stricto</i>.....</b>	<b>40</b>
RESUMO.....	40
1. INTRODUÇÃO.....	41
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
2.1 Tindalização do leite e avaliação de sua eficácia.....	43
2.2. Contaminação experimental do leite tindalizado.....	44
2.3. Contagem Populacional em Placas.....	45

2.4. Mensuração de NANA através da metodologia da Ninidrina Ácida.....	45
2.5. Análise Estatística.....	46
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
CONCLUSÃO.....	53
AGRADECIMENTOS.....	54
REFERÊNCIAS.....	55
DOCUMENTO SUPLEMENTAR 1.....	59
DOCUMENTO SUPLEMENTAR 2.....	60



***Bacillus cereus*: PRODUÇÃO DE METALLOPROTEINASES NA CADEIA PRODUTIVA DE LÁCTEOS E AVALIAÇÃO DA PROTEÓLISE DA KAPPA-CASEÍNA EM LEITE PASTEURIZADO**

**RESUMO** – As espécies do grupo do *Bacillus cereus* estão na cadeia produtiva do leite associadas a problemas tecnológicos por produzirem metaloproteínas. O controle deste microrganismo se faz necessário devido aos prejuízos causados por perdas. Com o objetivo de verificar a presença do gene *npr* (produção de metaloproteínas), *Plcr* (regulador pleitrópico) e *cspa* (assinatura psicotrófica), avaliar fenotipicamente os isolados quanto à capacidade proteolítica e mensurar a atividade deteriorante da mencionada enzima sobre a kappa-caseína, foram isolados da cadeia produtiva de lácteos, identificados e sequenciados genomicamente, microrganismos pertencentes ao grupo do *Bacillus cereus* que comprovadamente possuíam características proteolíticas e psicotróficas. De 466 amostras, obteve-se 69 isolados de *Bacillus cereus*, sendo que o gene *npr*, fenótipo proteolítico e *Plcr* estavam presentes em, respectivamente, 97,1%, 92,7% (64) e 88,4% (61) das amostras. O gene *cspa* foi identificado em 100% das amostras. Entretanto, fenotipicamente apenas um isolado comportou-se como tal, sugerindo a existência de outros fatores para expressão desta característica. A concentração de ácido siálico elevou-se durante o tempo de prateleira do produto, na média, de 3,99 µg/mL para 4,45 µg/mL no primeiro e último dia, respectivamente. Assim, devido a ampla distribuição do *Bacillus cereus* associada a sua resistência térmica e a elevada frequência de características proteolíticas, faz-se necessário a obtenção higiênica do leite, minimizando contaminações, para que produtos de qualidade possam ser elaborados.

**Palavras-chave:** biologia molecular, microbiologia, sequenciamento genômico, leite experimentalmente contaminado

***Bacillus cereus*: METALLOPROTEINASES PRODUCTION IN DAIRY  
PRODUCTION CHAIN AND KAPPA-CASEIN PROTEOLYSIS ASSESSMENT  
IN PASTEURIZED MILK.**

**ABSTRACT** – The species included in *Bacillus cereus* group are widespread in the dairy production chain and are often associated with technological failures in dairy products, due to the production of metalloproteinases. Controlling this microorganism is necessary due to economic losses. In order to assess the presence of *npr* gene (metalloproteinases production), *Plcr* (pleiotropic regulator) and *cspa* (psychotropic signature), proteolytic activity on plates and the spoilage potential of the enzyme on kappa-casein, *Bacillus cereus* samples which had proteolytic and psychotropic characteristics were isolated from dairy production chain and sequenced. A set of 69 isolates were obtained from 466 samples and the frequency of *npr* gene, proteolytic activity and *Plcr* were observed in, respectively, 97.1%, 92,7% and 88,4% of the samples. The *cspa* gene was present in all samples. However, only one sample demonstrated the psychotropic phenotype, suggesting the existence of other factors involved in the expression of this characteristic. Concentration of free sialic acid during the shelf life of pasteurized milk ranged from 3,99 µg/ml to 4.45 µg/ml in the first and last days of the storage period, respectively. Therefore, due to the wide distribution of *Bacillus cereus* associated with thermal resistance and high frequency of proteolytic features, hygienic milking practice is critical to decrease contamination and produce milk with higher quality.

**Key words:** genomic sequencing, microbiology, molecular biology

## CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais

### 1. Introdução

As bactérias pertencentes ao grupo do *Bacillus cereus* estão entre os contaminantes mais comuns na cadeia produtiva do leite, desde as propriedades leiteiras até o produto final. Devido à capacidade de esporulação, perpetuam-se mesmo em produtos termicamente tratados, tornando-se microrganismos de relevante importância no âmbito industrial por provocarem deterioração de produtos.

Estas bactérias possuem um elevado potencial toxigênico, estando frequentemente associadas a doenças transmitidas por alimentos (DTAs), causando duas importantes síndromes: diarreica e emética. Assim, torna-se fundamental o seu controle visando minimizar possíveis riscos à saúde pública.

Outro fator determinante em sua ampla distribuição é a capacidade de formação de biofilmes. Tal característica, associada à termoresistência, os tornam microrganismos extremamente bem-sucedidos e adaptados em linhas de processamento ocasionando recontaminação de produtos prontos para o consumo. Assim, uma vez formado o biofilme em equipamentos, associado ao modo de limpeza atual utilizado pela indústria (*clean in place*), dificilmente são removidos.

O poderio deteriorante ocasionado pela mencionada bactéria durante a tempo de prateleira de produtos lácteos é um dos principais percalços para os laticínios. Devido à produção de enzimas termoresistentes extracelulares (proteases, lipases e fosfolipases), causam prejuízos econômicos, devido a necessidade de *recalls* de produtos já distribuídos ao varejo, além de exposição negativa da marca perante os consumidores.

Diante da importância que as bactérias do grupo do *Bacillus cereus* possuem e vislumbrando uma melhor compreensão destes, este trabalho auxilia a compreensão dos mecanismos de deterioração proteica, contribuindo assim para minimizar as perdas econômicas e os riscos a saúde pública.

## 2. Revisão

O gênero *Bacillus* compreende o maior grupo de bactérias formadoras de esporos e tem se tornado um dos grupos mais estudados devido sua ação deteriorante de alimentos (KUMARI; SARKER, 2016). É composto por microrganismos Gram-positivos, em forma de bastão, relativamente grandes (1.0-1.2  $\mu\text{m}$  a 3.0-5.0  $\mu\text{m}$ ), móveis, aeróbios ou anaeróbios facultativos. São termoresistentes e suas células podem ser isoladas em grande diversidade de ambientes (BOTTONNE, 2010), estando entre as mais abundantes na rizosfera (OLIVEIRA et al., 2016).

Bactérias não patogênicas do gênero *Bacillus* são utilizadas comumente na indústria, como aplicações para fermentações alimentícias (TAMANG; WATANABE e HOLZAPFEL, 2016) e probióticos (ELSHAGHABEE et al., 2017). Devido ao fato de algumas cepas produzirem toxinas altamente patogênicas, também são utilizadas como potenciais armas biológicas, como a toxina antraz, produzida pelo *Bacillus anthracis* (HELGASON et al., 2004).

Dentro do gênero, destaca-se o *Bacillus cereus*, também denominado *Bacillus cereus sensu stricto*. Este é um microrganismo ubíquo amplamente distribuído na natureza e um contaminante comum de diversos alimentos. Frequentemente é associado a doenças transmitidas por alimentos (DTAs) (EL-ZAMKAN et al., 2017; ZHOU et al., 2015; LÓPEZ et al., 2015). Sabidamente, o *Bacillus cereus* s.s. é capaz de causar duas distintas síndromes: emética e a diarreica, sendo que, uma mesma bactéria pode causar ambas as síndromes (OH et al., 2012).

A síndrome diarreica é causada por toxinas as quais são sintetizadas e liberadas durante a multiplicação da bactéria no intestino delgado. Para isso, é necessária a ingestão de esporos ou células viáveis em quantidades suficientes para desencadear a enfermidade ( $>10^6$  UFC.ml<sup>-1</sup>). As toxinas causadoras da síndrome são termolábeis, sensíveis a ácidos gástricos e proteases (FOSSI et al., 2016; WANG et al., 2014). Com o avanço de novas tecnologias de identificação molecular, três enterotoxinas são identificadas como responsáveis, atualmente, pela ocorrência desta síndrome: a Hemolisina BL (Hbl), Enterotoxina não hemolítica (Nhe) e a Citotoxina (CytK),

respectivamente produzidas pelos genes *hblA*, *hblC* e *hblD*; *nheA*, *nheB* e *nheC*; e *cytK* (EHLING-SCHULZ et al., 2004).

Em relação à ocorrência da síndrome emética, até o presente momento uma única toxina (peptídeo cíclico não ribossomal) foi responsabilizada. Denominada cereulide (codificada pelo gene *ces*), esta toxina é liberada pelo *Bacillus cereus* s.s. durante a esporulação do microrganismo, sendo esta, portanto, pré-formada nos alimentos, a qual é termoestável (LUCKING et al., 2015). O período de incubação da síndrome emética geralmente é curto, podendo variar de 1 a 7 horas após a ingestão do alimento contaminado (SENESI; GHELARDI, 2010).

Algumas pesquisas referentes à classificação taxonômica ocorreram na última década e sugeriram alterações. Devido a sua similaridade genética com outras espécies, algumas destas foram compiladas em um único grupo, denominado Grupo do *Bacillus cereus*, ou *Bacillus cereus sensu lato* (s.l.). Pertencem a esses, atualmente, oito espécies: *B. cereus sensu stricto*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus weihenstephanensis*, *Bacillus cytotoxicus* (GUINEBRETIERE et al., 2013) e *Bacillus toyonensis* (JIMÉNEZ et al., 2013). Outras espécies são passíveis de inclusão neste grupo: *Bacillus wiedmannii* sp. nov. (MILLER et al., 2016), *Bacillus bingmayongensis* sp. nov. (LIU et al., 2014), *Bacillus manliponensis* sp. nov. (JUNG et al., 2011) e *Bacillus gaemokensis* sp. nov. (JUNG et al., 2010).

Devido a estreita relação genômica, a distinção destas não pode ser realizada através da sequência do gene 16S rRNA. Diante disto, com base em dados moleculares, sequências de genes ribossômicos e *panC* (pantotenato sintetase), assinaturas no DNA de cepas psicrotolerantes e temperatura de multiplicação, o grupo do *Bacillus cereus* foi dividido em sete grupos filogenéticos (KUMARI; SARKER, 2016).

O Grupo 1 é composto pelo *B. pseudomycoides*, o Grupo II pelo *B. thuringiensis* e *B. cereus*, o Grupo III pelo o *B. thuringiensis*, *B. cereus* e *B. anthracis*; o Grupo IV e Grupo V, *B. thuringiensis* e *B. cereus*; Grupo VI, *B.*

*thuringiensis*, *B. weihenstephanensis* e *B. mycoides*; e o Grupo VII integrado pelo *B. cereus*. O agrupamento realizado culmina com importantes consequências práticas, sendo possível verificar algumas características fenotípicas apenas pela genotipagem do referido gene, enfatizando as cepas pertencentes aos grupos II e VI, os quais possuem capacidade de multiplicação em temperaturas de refrigeração sendo consideradas psicotróficas. Microrganismos os quais sintetizam e liberam toxinas nocivas à saúde humana estão preferencialmente agrupadas no Grupo III (GUINEBRETIERE et al., 2008).

Apesar da similaridade genética, tais espécies divergem fenotipicamente visto que estas características são carregadas por plasmídeos (PATIÑO-NAVARRETE; SANCHES, 2016). Frequentemente, as bactérias pertencentes ao grupo são classificadas de acordo com os fenótipos e de características bioquímicas. A atividade hemolítica, motilidade, presença de cristais de toxinas e crescimento rizoide (SCHLEIFER; WHITMAN, 2009; FDA, 2012) são comumente utilizadas para diferencia-las.

Entretanto, apenas as características fenotípicas talvez não sejam suficientes para distinção das espécies. Através da possibilidade de transferência plasmidial dentro do grupo, já foram descritas espécies do grupo expressando fenótipos diferentes dos tradicionais destas, comportando-se assim, de modo distinto (SCARFF et al., 2016). A exemplo, relata-se cepas de *B. cereus sensu stricto* capazes de sintetizar toxinas semelhantes às produzidas pelo *B. anthracis*, as quais são mediadas por plasmídeos denominados pBCXO1 e pBCXO2 (SCARFF et al., 2016).

A completa distinção de espécies através de suas diferenças genômicas ainda está em estudo (CAAMAÑO-ANTELO et al., 2015). A construção de árvores filogenéticas capazes de evidenciar a formação de agrupamentos das cepas de acordo com suas características genômicas, potencial risco à saúde pública, entre outras características fenotípicas, tem sido um ponto de partida para diversas pesquisas (KOVAC et al., 2016).

Em relação a segurança dos alimentos, o *B. cereus* s.s. é considerado a espécie com maior importância dentro do grupo a qual pertence. Tal bactéria

tem temperatura ótima de multiplicação entre 28°C e 35°C, sendo já relatado multiplicação a 4°C e em 48°C. Devido à ampla faixa de temperatura a qual a mesma sobrevive e se multiplica, pode ser isolada em uma grande diversidade de alimentos. O tempo de geração da bactéria é 18 a 27 minutos, podendo multiplicar-se em valores de pH entre 4,9 a 9,3 (NOTERMANS; BATT, 1998).

Este agente é um dos mais comumente reportados em casos de DTAs com etiologia conhecida. Nos Estados Unidos, cerca de 19% dos surtos alimentares reportados no país entre 1998 e 2008 foram decorrentes do mencionado microrganismo (BENNET et al., 2013). Entretanto, o número de casos é subestimado devido a curta duração da sintomatologia (FOSSI et al. 2017). Contudo, o número de casos graves e letais causados pelo *Bacillus cereus* s.s. tem sido reportado na literatura com maior frequência nos últimos anos em diversos países, como na Bélgica e Japão (AL-ABRI et al., 2011; NARANJO et al., 2011; SAITO et al., 2010; SHIOTA et al., 2010; BOTTONE, 2010; DIERICK et al., 2005; MAHLER et al., 1997). Outras espécies dentro do gênero também são reportadas como importantes produtoras de toxinas, demonstrando também o risco à saúde pública que as mesmas proporcionam (KOVAC et al., 2016).

Diversos trabalhos relatam a presença do *Bacillus cereus* s.s. em produtos disponíveis no varejo, denotando os riscos que os consumidores são expostos. Fossi et al. (2016), analisando leite em pó disponível aos consumidores na República dos Camarões, isolaram *Bacillus cereus* s.s. em 13,3% das amostras colhidas, salientando tratar-se de um produto com baixa atividade de água e submetido a processo térmico com elevada temperatura. Lesley et al. (2017), analisando leites submetidos ao processo de Ultra Alta Temperatura e formulações infantis comercializados na Malásia, encontraram *Bacillus cereus* em, respectivamente, 30,0% e 41,7%. Os autores ressaltam a importância do controle da mencionada bactéria, visto o consumo majoritário dos produtos por eles analisados por faixas etárias jovens e mais susceptíveis a tais enfermidades.

Ainda demonstrando a resistência térmica da mencionada bactéria, Vidal-Martins et al. (2005) pesquisaram microrganismos do grupo do *Bacillus*

*cereus* em 118 amostras de leite (36 amostras de leite cru, 55 de pasteurizado e 27 de UAT), das quais foram isolados, respectivamente, em 12, 24 e 24 amostras. Tais resultados demonstram a importância da qualidade da matéria-prima, pois uma vez a bactéria instalada no produto ou na planta industrial, dificilmente haverá remoção dela por meios de conservação convencionais e de procedimentos de limpeza visto a sua resistência e ao alto poder de aderência com conseqüente formação de biofilme (CHMIELEWSKI; FRANK, 2003).

Outros trabalhos demonstram a importância da resistência térmica do *Bacillus cereus* s.s. em leites fluídos e citam que tal bactéria é um dos fatores limitantes para o incremento da qualidade de leites os quais foram submetidos a tratamentos térmicos (IVY et al. 2012). Lin et al. (2017) obtiveram 43 isolados de *Bacillus cereus* s.s. de amostras coletadas dentro de uma planta industrial em tanques pré e pós-pasteurização, assim como em leites UAT prontos para o consumo. Chaves et al. (2017) também isolaram *Bacillus cereus* s.s. de amostras de leite UAT (24) e de leite pasteurizado (3), adquiridas no comércio varejista da cidade do Rio de Janeiro.

A presença de *Bacillus cereus* já foi reportada em outras pesquisas utilizando diferentes produtos lácteos, como queijos tipo ricota (SPANU et al., 2016), leites pasteurizados (SALEH-LAKHA et al., 2017), leite em pó (FOSSI et al., 2017), leites fermentados (WONG et al., 1988), soro de leite (PIRTTIJARVI et al., 1998) e queijos (FADDA et al., 2012).

Além de ocasionar agravos à saúde devido à produção de toxinas, algumas cepas de *B. cereus* s.s. têm sido reportadas como microrganismos capazes de causar bacteremia. Schaefer et al. (2016) observaram tal capacidade em pessoas que faziam uso de drogas injetáveis. Sasahara et al. (2011) observaram a mesma capacidade em cepas isoladas em hospitais que possuíam utensílios contaminados com esporos do referido microrganismo. Hilliard et al. (2003) relataram a ocorrência de bacteremia em um recém-nascido de 19 dias de vida, o qual teve seu tratamento bem-sucedido com antibióticos específicos contra o agente. Casos de *Bacillus cereus* neuro invasivos também foram reportados. Rhee et al. (2015) relatam a ocorrência de



cinco casos em um mesmo hospital de bacteremias atingindo o sistema nervoso de pacientes em um período de 9 meses de estudo. Os autores chegaram à conclusão que um fator preponderante para tal acometimento é a exposição de indivíduos imunocomprometidos ao *Bacillus cereus*.

Outro fato de relevante importância na epidemiologia do *Bacillus cereus* é a capacidade de formação de biofilmes. Estes são capazes de formar comunidades bacterianas com estruturas complexas, as quais permitem cooperação entre os microrganismos presentes resultando em proteção e sobrevivência mútua e resistência a condições e ambientes hostis (PASVOLSKY et al., 2014). Seus esporos possuem natureza hidrofóbica, o que auxilia na adesão em superfícies comumente utilizadas em indústrias processadoras de alimentos, como o aço inoxidável (ANKOLEKAR; LEBBE, 2010), possibilitando assim a recontaminação de produtos que foram tratados termicamente, culminando com o aumento da quantidade de microrganismos presente no produto acabado e diminuindo o tempo de prateleira do mesmo (RYU; BEUCHAT, 2005).

O aço inoxidável é utilizado amplamente como superfície de contato com a matéria-prima nas indústrias processadoras de alimentos. Entretanto, em sua estrutura microscópica podem ser verificadas pequenas ranhuras e fendas, as quais possibilitam a aderência de microrganismos e posterior formação de biofilmes (MAJED et al., 2016). Analisando a formação de biofilmes em diferentes materiais, foi demonstrada a maior formação destas comunidades em superfícies de aço inoxidável quando comparados a outros materiais utilizados na indústria, como o poliestireno (HAYRAPETYAN et al., 2015). Tais resultados demonstram que, talvez, os materiais comumente utilizados na indústria possam ser inadequados quando avaliados a possibilidade de agregação bacteriana.

Além das tubulações que tem contato com a matéria-prima, as quais são comumente fabricadas em aço inoxidável, ferramentas de limpeza e outros equipamentos utilizados também são passíveis de formação de biofilmes. Outras superfícies que entram em contato direto com o leite, por exemplo, como pasteurizadores, tanques de armazenamento, máquinas de envase,

embaladeiras, representam também pontos sujeitos a formação destes, salientando como importantes fontes de contaminação pós-pasteurização (MAJED et al., 2016).

Ressalta-se ainda que, o grupo dos *B. cereus* possui importância na indústria processadora de leite não somente pelo potencial formador de biofilmes, mas também por desencadear problemas de deterioração e redução do tempo de prateleira dos produtos. Esses microrganismos produzem enzimas extracelulares dentre as quais são citadas lipases, metaloproteinases, lecitinases e fosfolipases (SIMÕES et al., 2010; KUMARI; SARKAR, 2016). A ação das metaloproteinases ocorre por meio da hidrólise da caseína culminando com a coagulação da mesma. Além disso, as lipases ocasionam a hidrólise dos triglicerídeos resultando em uma maior concentração de ácidos graxos livres e degradação de lipídeos (JONGHE et al., 2010).

Salienta-se ainda que as mencionadas enzimas são termorressistentes, em sua maioria, e permanecem viáveis mesmo após tratamentos térmicos aplicados nos produtos lácteos (ABEE et al., 2011). Estudos relatam a continuidade da viabilidade da ação deteriorante de enzimas após o tratamento UAT variando de 30% a 100%, demonstrando a ineficiência dos métodos de conservação atuais quanto à inativação destas (SAMARZIJA et al., 2012).

O prejuízo ocasionado pela deterioração de produtos através de enzimas proteolíticas e lipolíticas é um dos principais desafios da indústria de leite. Estimam-se perdas de até 30% de produtos ocasionados por deteriorações deste tipo (SAMARZIJA et al., 2012), principalmente em produtos cujo o tempo de prateleira são maiores.

As alterações ocasionadas por tais enzimas nos produtos lácteos ocasionam perdas econômicas, visto que diminuem a vida de prateleira dos mesmos, além de alterá-los sensorialmente, inviabilizando o consumo destes (DE JONGHE et al., 2010). Quando presentes em leite submetidos ao tratamento de ultra alta temperatura (UAT), que possuem um longo prazo de validade, as metaloproteinases podem causar a geleificação destes, provocando desestabilização das caseínas, o que favorece a agregação das micelas (VIDAL-MARTINS et al., 2005). Dentre as caseínas presentes no leite,

as metaloproteinases atuam preferencialmente sobre a kappa-caseína, provocando a desestabilização da mesma (MARTH; STEELE, 1998).

A hidrólise da caseína ocasionada pela ação das metaloproteinases resulta na ruptura da ligação peptídica entre a fenilalanina (105) e a Metionina (106) da cadeia peptídica da kappa-caseína, eliminando a capacidade estabilizante desta. Entre tais aminoácidos também é o local utilizado pela renina na coagulação do leite para a fabricação de queijos (GARCÍA-ROMERO; MAYORGA-LLERENA, 2015), resultando nas mesmas porções. Como resultado desta hidrólise, são liberados dois subprodutos: a para-kappa-caseína e o glicomacropéptido (GMP), também denominado caseínomacropéptido (CMP), sendo que a primeira é hidrofóbica e o segundo hidrofílico, provocando a desestabilização da micela com consequente precipitação da caseína do leite (BRASIL et al., 2015). Através do processo de hidrólise, a kappa-caseína pode ser convertida completamente em para-kappa-caseína e reduzir em até 70% a concentração de beta-caseína (MARTH; STEELE, 1998).

Dentre as muitas metaloproteinases secretadas pelo *B. cereus sensu stricto*, destacam-se as *neutral metallopeptidases*, que são enzimas codificadas pelo gene *npr* e são altamente influenciadas por fatores ambientais, como a temperatura (VON STETTEN et al., 1999). Tal gene (*npr*) é conservado no *B. cereus* s.s. e constantemente utilizado como referência para detecção molecular de atividade proteolítica desta espécie (BACH et al., 2001).

Um dos principais mecanismos de regulação da produção de metaloproteinases é a presença do regulador pleiotrópico *Plcr*. Este é responsável pela regulação de diversos fatores do *B. cereus sensu stricto*, dentre eles metaloproteinases e fosfolipases (GOHAR et al., 2002). Estima-se que ao menos 15 genes sejam regulados pelo *Plcr* em bactérias do grupo do *Bacillus cereus* (ØKSTAD et al., 1999).

Diversos produtos são afetados negativamente pela presença de enzimas deteriorantes secretadas pelas bactérias do grupo do *B. cereus*. Ao analisar o potencial deteriorante de bactérias do gênero *Bacillus* em leites UAT experimentalmente contaminados, Murugan e Villi (2009) observaram o *B.*

*subtilis* sendo o principal responsável pela redução no nitrogênio ligado à caseína, com diminuição de 4,82% em comparação ao controle. Quando verificada a mesma variável, a redução foi de 4,15% quando o *B. cereus* s.s. foi o responsável pelas secreções enzimáticas. Ainda, relatam a ocorrência de coagulação em graus elevados em ambos os leites contaminados experimentalmente quando incubados a 37°C durante 30 horas.

Em geral, leites fermentados não são um ambiente favorável para a multiplicação de bactérias degradantes devido ao baixo pH encontrado (4,2 – 4,6). Entretanto, o tempo de prateleira deste tipo de produto pode ser afetado quando o leite utilizado na fabricação do mesmo ficou estocado por longos períodos previamente a industrialização, propiciando a secreção dessas enzimas, as quais persistirão, em sua maioria, durante o tempo de prateleira do produto (ROSSLAND et al., 2005). Devido à ação hidrolítica ocasionada na kappa-caseína, os produtos lácteos fermentados tendem a ter sua viscosidade aumentada, resultando em uma percepção diferente da idealmente desejada para este tipo de produto (GASSEM; FRANK, 1991).

Considerando que o leite cru refrigerado é utilizado para a fabricação de manteiga, bactérias psicrófilas, dentre elas o *B. cereus sensu lato*, produtoras de enzimas degradantes são as principais causas de perda de qualidade e redução do tempo de prateleira destes produtos (SPREER, 1998). Devido ao alto teor de gordura encontrado neste tipo de produto, lipases secretadas pelos microrganismos são largamente responsabilizadas por tais perdas (KORNACKI; FLOWERS, 1998).

Em relação à produção de queijos, microrganismos secretores de enzimas proteolíticas e lipolíticas afetam o produto, sendo que contaminações acima de  $10^3$  UFC.ml<sup>-1</sup> já influenciam diretamente o rendimento destes. Salienta-se que, apesar do leite cru recém-obtido apresentar poucos microrganismos psicrófilos degradantes, em comparação com os mesófilos, em apenas dois dias de refrigeração, populações variando  $10^5$  UFC.ml<sup>-1</sup> e  $10^8$  UFC.ml<sup>-1</sup> são comumente encontradas (SAMARŽIJA et al., 2012). No Brasil, este tempo de armazenamento é comum e permitido de acordo com a Instrução Normativa N°62 (BRASIL, 2011). Visto isso, é de extrema importância

a rápida industrialização do produto visando minimizar a multiplicação bacteriana secretora de enzimas deteriorantes, das quais o *B. cereus sensu lato* integra.

Particularmente em queijos duros e semiduros de longa maturação, sabores indesejáveis podem ocorrer durante esse processo devido a ação de tais enzimas (FOX, 1981). Em relação a queijos frescos, a textura dos mesmos pode ser afetada também, causando desuniformidade do produto e afetando a sua comercialização (SAMARŽIJA et al., 2012), causando assim prejuízos as indústrias.

Como mencionado anteriormente, os subprodutos oriundos do processo hidrólise da caseína, tanto pela ação da renina quanto pela ação das metaloproteinases, são semelhantes. Os métodos de mensuração destes subprodutos tornam-se importante para avaliar o potencial deteriorante do *Bacillus cereus* s.s. Os métodos mais utilizados para isso são a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), a qual é internacionalmente aceita para a quantificação do glicomacropéptido (GMP) (ANDRADE et al., 2014) e o método da Ninidrina Ácida (VILLANOEVA et al., 2014), a qual quantifica o mesmo subproduto.

Ambos os métodos possuem precisão na mensuração do GMP. Apesar das qualidades, o CLAE é uma metodologia cara e demorada, não estando disponível na maioria dos laboratórios. Em alternativa, com base na presença de ácido siálico (NANA - N-acetyl Neuraminic Acid) na molécula de GMP, foi desenvolvido e mostrou-se efetivo um método espectrofotométrico na região visível do espectro que, rápido e barato, consegue mensurar tal subproduto. Comparado experimentalmente ao CLAE, ofereceu uma boa correlação ( $r = 0,996$ ) (PRATA, 2009).

Devido ao impacto negativo causado pelos processos enzimáticos originados pelo *Bacillus cereus* s.l., o controle deste grupo bacteriano se faz necessário devido à dificuldade de removê-lo uma vez alcançada a matéria-prima. A ubiquidade, associada à sua adaptação a condições adversas, a torna uma bactéria extremamente desafiadora no setor das indústrias e no aspecto da saúde pública. Visto isso, faz-se necessária a utilização de procedimentos de autocontrole em toda a cadeia produtiva de leite (SAMARŽIJA et al., 2012),

visando a higiene operacional da produção e culminando com produtos finais de qualidade. Ainda, a rápida industrialização do leite minimiza a multiplicação bacteriana contaminante, que é tão importante quanto os procedimentos de higiene, em consequência da elevação populacional exponencial bacteriana.

Devido à grande heterogeneidade presente no *Bacillus cereus s. l.*, não há um padrão operacional único a ser seguido visando minimizar a contaminação. Diante disso, a utilização de equipamentos de fácil higienização pode ser um fator preponderante na diminuição da contaminação pós-industrialização (SAMARŽIJA et al., 2012).

Como consequência, a realização do presente estudo possui uma importante contribuição para o melhor entendimento dos mecanismos de ação ligados ao *Bacillus cereus s.l.* quanto a ação de metaloproteínases, bem como verificar a deterioração proteica ocasionada por este microrganismo, auxiliando a compreensão e possibilitando a adoção de ações visando minimizar os prejuízos econômicos decorrente da presença destas.

## **Objetivos**

- Isolar, identificar e selecionar microrganismos do grupo do *Bacillus cereus s.s.* sintetizadores de metaloproteínases, identificando o gene de referência e seu principal regulador (*npr* e *PlcR*);
- Relacionar genótipo e o fenótipo dos isolados a fim de verificar correspondência entre estes;
- Verificar o potencial deteriorante de *Bacillus cereus s.s.*

## REFERENCIAS

- ABEE, T.; KOVÁCS, Á. T.; KUIPERS, O. P.; VAN DER VEEN, S. Biofilm formation and dispersal in Gram-positive bacteria. **Current opinion in biotechnology**, v. 22, p. 172-179, 2011.
- AL-ABRI, S. S.; AL-JARDANIA, A. K.; AL-HOSNIA, M. S.; KURUPB, P. J.; AL-BUSAIDI, S.; BEECHING, N. J. A hospital acquired outbreak of *Bacillus cereus* gastroenteritis. **Journal of Infection and Public Health**, v. 4, p. 180-186, 2011.
- ANDRADE, E. H. P.; SOUZA, M. R.; FONSECA, L. M.; PENNA, C. F. A. M.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; ROZA, T.; LEITE, M. O. Detection of cheese whey and caseinomacropeptide in fermented milk beverages using high performance liquid chromatography. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, p. 959-964, 2014.
- ANKOLEKAR, C.; LEBBE, R. G. Physical characteristics of spores of food-associated isolates of the *Bacillus cereus* group. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, p. 982-984, 2010.
- BACH, H. J.; HARTMANN, A.; SCHLOTTER, M.; MUNCH, J. C. PCR primers and functional probes for amplification and detection of bacterial genes for extracellular peptidases in single strains and in soil. **Journal of Microbiological Methods**, v. 44, p. 173–182, 2001.
- BENNET, S. D.; WALSH, K. A.; GOULD, L. H. Foodborne disease outbreaks caused by *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, and *Staphylococcus aureus* — United States, 1998–2008. **Clinical Infectious Diseases**, v. 57, n. 3, p. 425-433, 2013.
- BOTTONE, E. J. *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. **Clinical microbiology reviews**, v. 23(2), p. 382-398, 2010.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília. Seção 1, p. 6, 2011.

BRASIL, R. B.; NICOLAU, E. S.; CABRAL, J. F.; SILVA, M. A. P. D. Estrutura e estabilidade das micelas de caseína do leite bovino. **Ciência Animal**. v. 25, p. 71-80, 2015.

CAAMAÑO-ANTELO, S.; FERNÁNDEZ-NO, I. C.; BÖHME, K.; EZZAT-ALNAKIP, M.; QUINTELA-BALUJA, M.; BARROS-VELÁZQUEZ, J.; CALO-MATA, P. Genetic discrimination of foodborne pathogenic and spoilage *Bacillus* spp. based on three housekeeping genes. **Food microbiology**, v. 46, p. 288-298, 2015.

CHAVES, J. Q.; DE PAIVA, E. P.; RABINOVITCH, L.; VIVONI, A. M. Molecular Characterization and Risk Assessment of *Bacillus cereus* Sensu Lato Isolated from Ultrahigh-Temperature and Pasteurized Milk Marketed in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of food protection**, v. 80, p. 1060-1065, 2017

CHMIELEWSKI, R.A.N.; FRANK, J.F. Biofilm formation and control in food processing facilities. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. v. 2, p. 22-32, 2003.

DE JONGHE V., COOREVITS A., DE BLOCK J., VAN COILLIE E., GRIJSPEERDT K., HERMAN L. Toxinogenic and spoilage potential of aerobic spore-formers isolated from raw milk. Int. **Journal of Food Microbiology**. 136 318–32, 2010

DIERICK, K.; VAN COILLIE, E.; SWIECICKA, I.; MEYFROIDT, G.; DEVLIEGER, H.; MEULEMANS, A.; HOEDEMAEKERS, G.; FOURIE, L.; HEYNDRICKX, M.; MAHILLON, J. Fatal family outbreak of *Bacillus cereus*-associated food poisoning. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 43, p. 4277-4279, 2005.

EHLING-SCHULZ, M.; FRICKER, M.; SCHERER, S. *Bacillus cereus*, the causative agent of an emetic type of food-borne illness. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 48, p. 479-487, 2004.

EL-ZAMKAN, M. A.; MUBARAK, A. G. Detection of *B. cereus* and some of its virulence genes in some dairy desserts and children diarrhea. **Alexandria Journal for Veterinary Sciences**, v. 53, p. 28-38, 2017.



ELSHAGHABEE, F. M. F.; ROKANA, N.; GULHANE, R. D.; SHARMA, C.; PANWAR, H. *Bacillus* as potential probiotics: status, concerns, and future Perspectives. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1490, 2017.

FADDA, A.; DELOGU, A.; MURA E.; NOLI A. C.; PORQUEDDU G.; ROSSI, M. L.; TERROSU, G. Presenza di *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* e Enterobacteriaceae in ricotta fresca e salata: controlli ufficiali in el periodo 2009 – 2012. **Italian Journal of Food Safety**, v. 1, n. 5, p. 43-45, 2012.

FDA, Food and Drug Administration. **The Bad Bug Book, Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins**, Ed. 2, 2012.

FOSSI, B.; TATAH KIHILA AKOACHERE, J. F.; NCHANJI, G. T.; WANJI, S. Occurrence, heat and antibiotic resistance profile of *Bacillus cereus* isolated from raw cow and processed milk in Mezam Division, Cameroon. **International Journal of Dairy Technology**, v. 70(1), p. 43-51, 2017.

FOX, F.P. Proteinases in Dairy Technology. **Netherlands Milk and Dairy Journal**, v. 35, p. 233-253, 1981.

GARCÍA-ROMERO, A.; MAYORGA-LLERENA, E. Correlación de glicomacropéptido de lacto suero dulce con proteasas de bacterias psicrótrofas e identificación de leche adulterada. **Anais X Congreso de ciencia y tecnología Espe**, 2015.

GASSEM, M. A.; FRANK, J. F. Physical properties of yogurt made from milk treated with proteolytic enzymes. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 1503-1511, 1991.

GOHAR, M., ØKSTAD, O. A., GILOIS, N., SANCHIS, V., & LERECLUS, D. Two-dimensional electrophoresis analysis of the extracellular proteome of *Bacillus cereus* reveals the importance of the PlcR regulon. **Proteomics**, v. 2, p. 784-791, 2002.

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., 2008. Ecological diversification in the *Bacillus cereus* group. **Environmental Microbiology**, v.10, p.851-865, 2008.

GUINEBRETIERE, M. H.; AUGER, S.; GALLERON, N.; CONTZEN, M.; SARRAU B.; BUYSER, M. L.; LAMBERET, G.; FAGERLUND, A.; GRANUM, P. E.; LARECLUS, D.; VOS, P.; NGUYEN-THE, C.; SOROKIN, A. *Bacillus cytotoxicus* sp. nov. is a novel thermotolerant species of the *Bacillus cereus* Group occasionally associated with food poisoning. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, n. 63, p. 31–40, 2013.

HAYRAPETYAN, H.; MULLER, L.; TEMPELAARS, M.; ABEE, T.; GROOT, M. N. Comparative analysis of biofilm formation by *Bacillus cereus* reference strains and undomesticated food isolates and the effect of free iron. **International journal of food microbiology**, v. 200, p. 72-79, 2015.

HELGASON, E.; TOURASSE, N. J.; MEISAL, R.; CAUGANT, D. A.; KOLSTØ, A. B. Multilocus sequence typing scheme for bacteria of the *Bacillus cereus* group. **Applied and environmental microbiology**, v. 70, p. 191-201, 2004.

HILLIARD, N. J.; SCHELONKA, R. L.; WAITES, K. B. *Bacillus cereus* bacteremia in a preterm neonate. **Journal of clinical microbiology**, v. 41(7), p. 3441-3444, 2003.

IVY, R. A.; RANIERI, M. L.; MARTIN, N. H.; DEN BAKKER, H. C.; XAVIER, B. M.; WIEDMANN, M.; BOOR, K. J. Identification and characterization of psychrotolerant sporeformers associated with fluid milk production and processing. **Applied Environmental Microbiology**, v. 78, p. 1853–1864, 2012.

JIMÉNEZ, G.; URDIAIN, M.; CIFUENTES, A.; LÓPEZ-LÓPEZ, A.; BLANCH, A. R.; TAMAMES, J.; KAMPFER, P.; KOLSTO, A. B.; RAMÓN, D.; MARTÍNEZ, J.F.; CODOÑER, F. M.; ROSSELLÓ-MÓRA, R. Description of *Bacillus toyonensis* sp. nov., a novel species of the *Bacillus cereus* group, and pairwise genome comparisons of the species of the group by means of ANI calculations. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 36, n. 6, p. 383-391, 2013.

JUNG, M. Y.; PAEK, W. K.; PARK, I. S.; HAN, J.R.; SIN, Y., PAEK, J., RHEE, M. S.; KIM, H.; SONG, H. S.; CHANG, Y. H. *Bacillus gaemokensis* sp. nov.,

isolated from foreshore tidal flat sediment from the Yellow Sea. **The Journal of Microbiology**, v. 48, n. 6, p. 867-871, 2010.

JUNG, M. Y.; KIM, J. S.; PAEK, W. K.; LIM, J.; LEE, H.; KIM, P. I.; MA, J. Y.; KIM, W.; CHANG, Y. H. *Bacillus manliponensis* sp. nov., a new member of the *Bacillus cereus* group isolated from foreshore tidal flat sediment. **The Journal of Microbiology**, v. 49, n. 6, p. 1027-1032, 2011.

KORNACKI, J. L.; FLOWERS, R. S. Microbiology of Butter and Related Products. **Applied Dairy Microbiology**, New York, p. 109-130, 1998.

KOVAC, J.; MILLER, R. A.; CARROLL, L. M.; KENT, D. J.; JIAN J.; BENO, S. M.; WIEDMANN, M. Production of hemolysin BL by *Bacillus cereus* group isolates of dairy origin is associated with whole-genome phylogenetic clade. **BMC Genomics**, v. 17, n.581, 2016.

KUMARI, S.; SARKAR, P. K. *Bacillus cereus* hazard and control in industrial dairy processing environment. **Food Control**, v. 69, p. 20-29, 2016.

LESLEY, M. B.; ERNIE, S. R.; KASING, A.; SON, R. Detection of *Bacillus cereus* in formula milk and ultra high temperature (UHT) treated milk products. **International Food Research Journal**, v. 24, p. 985-989, 2017.

LIN, Y.; REN, F.; ZHAO, L.; GUO, H. Genotypes and the persistence survival phenotypes of *Bacillus cereus* isolated from UHT milk processing lines. **Food Control**, v. 82, p. 48-56, 2017

LIU, B.; LIU, G. H.; HU, G. P.; CETIN, S.; LIN, N. Q.; TANG, J. Y.; TANG, W. Q.; LIN, Y. Z. *Bacillus bingmayongensis* sp. nov., isolated from the pit soil of Emperor Qin's Terra-cotta warriors in China. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 105, n. 3, p. 501-510, 2014.

LÓPEZ, A. C.; MINNAARD, J., PÉREZ, P. F.; ALIPPI, A. M. A case of intoxication due to a highly cytotoxic *Bacillus cereus* strain isolated from cooked chicken. **Food microbiology**, v. 46, p. 195-199, 2015.

LÜCKING, G.; FRENZEL, E.; RÜTSCHLE, A.; MARXEN, S.; STARK, T. D.; HOFMANN, T.; SCHERER, S.; EHLING-SCHULZ, M. *Ces* locus embedded

proteins control the non-ribosomal synthesis of the cereulide toxin in emetic *Bacillus cereus* on multiple levels. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1001, 2015.

MAHLER, H.; PASI, A.; KRANER, J. M.; SCHULTE, P.; SCOGING, A. C.; BAR, W.; KRAHENBUHL, S. Fulminant liver failure in association with the emetic toxin of *Bacillus cereus*. **The New England Journal of Medicine**. V. 336, p. 1142-1148, 1997.

MAJED, R.; FAILLE, C.; KALLASSY, M.; GOHAR, M. *Bacillus cereus* Biofilms - Same, Only Different. **Frontier microbiology**, v.7, 2016.

MARTH, E. H.; STEELE, J. L. **Applied Dairy Microbiology**. Marcel Dekker, INC, New York, 516 p. 1998.

MILLER, R. A.; BENO, S. M.; KENT, D. J.; CARROLL, L. M; MARTIN, N. H.; BOOR, K. J.; KOVAC, J. *Bacillus wiedmannii* sp. nov. is a new psychrotolerant and cytotoxic *Bacillus cereus* group species isolated from dairy foods and environments in the USA. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, p. 4744-4753, 2016.

MURUGAN, B.; VILLI, R. A. Lipolytic activity of *Bacillus* species isolated from milk and dairy products. **The Indian Veterinary Journal**. v. 86, p. 80-81, 2009.

NARANJO, M.; DENAYER, S.; BOTTELDOORN, N.; DELBRASSINNE, L.; VEYS, J.; WAEGENAERE, J.; SIRTAINÉ, N.; DRIESEN, R. B.; SIPIDO, K. R.; MAHILLON, J.; DIERICK, K. Sudden death of a young adult associated with *Bacillus cereus* food poisoning. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 12, p. 4379-4381, 2011

NOTERMANS, S.; BATT, C. A. A risk assessment approach for food-borne *Bacillus cereus* and its toxins. **Journal of Applied Microbiology**, 84, 51S, 1998.

OH, M. H.; HAM, J. S.; COX, J. M. Diversity and toxigenicity among members of the *Bacillus cereus* group. **International Journal of Food Microbiology**, v. 152, n. 1-2, p. 1-8, 2012.

OLIVEIRA, G. R. F.; SILVA, M. S.; MARCIANO, T. Y. F.; PROENÇA, S. L.; SÁ, M. E. Crescimento inicial do feijoeiro em função do vigor de sementes e inoculação com *Bacillus subtilis* / early growth of common bean plants in response to vigour seeds and inoculation with *Bacillus subtilis*. **Revista Brasileira de Engenharia de Biosistemas**, v. 10(4), p. 439-448, 2016.

ØKSTAD, O. A., GOMINET, M., PURNELLE, B., ROSE, M., LERECLUS, D., KOLSTØ, A. B., **Microbiology**, v. 145, p. 3129–3138, 1999.

PASVOLSKY, R.; ZAKIN, V.; OSTROVA, I.; SHEMESH, M. Butyric acid released during milk lipolysis triggers biofilm formation of *Bacillus* species. **International Journal of Food Microbiology**, v. 181, p. 19-27, 2014.

PATIÑO-NAVARRETE, R.; SANCHIS, V. Evolutionary processes and environmental factors underlying the genetic diversity and lifestyles of *Bacillus cereus* group bacteria. **Research in microbiology**, v. 168, p. 309-318, 2017.

PIRTTIJARVI, T. S. M.; AHONEN, L. M.; MAUNUKSELA, L. M.; SALKINOJA-SALONEN, M. S. *Bacillus cereus* in a whey process. **International Journal of Food Microbiology**, v. 44, p. 31–41, 1998.

PRATA, L. F. Determinação de (Glicomacropéptido) no leite por meio da quantificação do ácido siálico – Esclarecimentos para adoção e implantação do método. **Revista Indústria de Laticínios**, v. 16, n. 81, p. 75-80, 2009.

RHEE, C.; KLOMPAS, M.; TAMBURINI, F. B.; FREMIN, B. J.; CHEA, N.; EPSTEIN, L.; GEE, J. Epidemiologic investigation of a cluster of neuroinvasive *Bacillus cereus* infections in 5 patients with acute myelogenous leukemia. In **Open forum infectious diseases**. Oxford University Press, v. 2, n. 3. 2015.

ROSSLAND, E.; LANGSRUD, T.; SORHAUG, T. Influence of controlled lactic fermentation on growth and sporulation of *Bacillus cereus* in milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 103, p. 69-77, 2005.

RYU, J. H.; BEUCHAT, L. R. Biofilm formation and sporulation by *Bacillus cereus* on a stainless steel surface and subsequent resistance of vegetative

cells and spores to chlorine, chlorine dioxide, and a peroxyacetic acid-based sanitizer. **Journal of Food Protection**, v. 68, p. 2614-2622, 2005.

SAITO, M.; TAKAHASHI, N.; UEDA, S.; KUWABARA, Y.; KOMIYAMA, M.; KOIKE, Y.; YADA, Y.; HONMA, Y.; MOMOI, M.Y. Cytokine profile in a premature infant with systemic *Bacillus cereus* infection. **Pediatrics International**. v. 52, p. 34-36, 2010.

SALEH-LAKHA, S.; LEON-VELARDE, C. G.; CHEN, S.; LEE, S.; SHANNON, K.; FABRI, M.; KEOWN, B. A Study To Assess the Numbers and Prevalence of *Bacillus cereus* and Its Toxins in Pasteurized Fluid Milk. **Journal of Food Protection**, v. 80, p. 1085-1089, 2017.

SAMARZIJA, D.; ZAMBERLIN, S.; POGAČIĆ, T. Psychrotrophic bacteria and milk and dairy products quality. **Mljekarstvo**, v. 62, p. 77-95, 2012.

SASAHARA, T.; HAYASHI, S.; MORISAWA, Y.; SAKIHAMA, T.; YOSHIMURA, A.; HIRAI, Y. *Bacillus cereus* bacteremia outbreak due to contaminated hospital linens. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 30, n. 2), p. 219-226, 2011.

SCARFF, J. M.; RAYNOR, M. J.; SELDINA, Y. I.; VENTURA, C. L.; KOEHLER, T. M.; O'BRIEN, A. D. The roles of AtxA orthologs in virulence of anthrax-like *B. cereus* G9241. **Molecular Microbiology**, v. 102, n. 4, p.545-561, 2016.

SCHAEFER, G.; CAMPBELL, W.; JENKS, J.; BEESLEY, C.; KATSIVAS, T.; HOFFMASTER, A.; REED, S. Persistent *Bacillus cereus* bacteremia in 3 persons who inject drugs, San Diego, California, USA. **Emerging infectious diseases**, v. 22, p. 1621, 2016.

SCHLEIFER, K; WHITMAN, W. B. **Bergey's manual of systematic bacteriology**: The Firmicutes. 2nd ed. New York: Springer; 2009.

SENESI, S., GHELARDI, E. Production, Secretion and Biological Activity of *Bacillus cereus* enterotoxins. **Toxins**. v. 2, p. 1690-1703, 2010.

SHIOTA, M.; SAITOU, K.; MIZUMOTO, H.; MATSUSAKA, M.; AGATA, N.; NAKAYAMA, M.; KAGE, M.; TATSUMI, S.; OKAMOTO, A.; YAMAGUCHI, S.;

OHTA, M.; HATA, D. Rapid detoxification of cereulide in *Bacillus cereus* food poisoning. **Pediatrics**. v. 125, p. 951-958, 2010.

SIMÕES, A. S.; MORI, R. Y.; FARIA, R.; CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.. Desempenho da matriz híbrida sio2-quitosana na imobilização da lipase microbiana de *Candida rugosa*. **Quimica Nova**, Lorena, v. 34, p. 33-38, 2010.

SPANU, C.; SCARANO, C.; SPANU, V.; PALA, C.; CASTI, D.; LAMON, S.; DE SANTIS, E. P. Occurrence and behavior of *Bacillus cereus* in naturally contaminated ricotta salata cheese during refrigerated storage. **Food microbiology**, v. 58, p. 135-138, 2016.

SPREER, E. **Milk and dairy product technology**. Marcel Dekker, Inc., New York, p. 203-241, 1998.

TAMANG, J. P.; WATANABE, K.; HOLZAPFEL, W. H. Review: Diversity of Microorganisms in Global Fermented Foods and Beverages. **Frontiers in Microbiology**. v. 7, p. 377, 2016

VIDAL, A. M. C.; SALOTTI, B. M.; ROSSI JUNIOR, O. D.; PENNA, A. L. B. Evolução do índice proteolítico e do comportamento reológico durante a tempo de prateleira de leite UAT/UHT. **Food Science and Technology**, 698-704, 2005.

VILLANOEVA, C. N. B. C.; ANDRADE, E. H. P.; BAFFA JUNIOR, J. C.; SOUZA, M. R.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; FONSECA, L. M.; LEITE, M. O. Caseinomacropetide index in UHT whole milk stored under different conditions of temperature and time. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, p. 289-296, 2014.

VON 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**. 1:503–515, 1999.

WANG, J.; DING, T.; OH, D. H. Effect of temperatures on the growth, toxin production, and heat resistance of *Bacillus cereus* in cooked rice. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 11, n. 2, 2014.

WONG, H. C.; CHANG, M. H; FAN, J. Y. Incidence and characterization of *Bacillus cereus* isolates contaminating dairy products. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, p. 699-702, 1988.

ZHOU, J.; PENG, Z.; LONG, J.; SOSSO, D.; LIU, B.; EOM, J. S.; WHITE, F. F. Gene targeting by the TAL effector PthXo2 reveals cryptic resistance gene for bacterial blight of rice. **The Plant Journal**, v. 82, p. 632-643, 2015.



## **CAPÍTULO 2 - CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE METALOPROTEINASES SINTETIZADAS POR *Bacillus cereus* s.s. ISOLADOS AO LONGO DA CADEIA PRODUTIVA DO LEITE E DERIVADOS LÁCTEOS**

**RESUMO** – O grupo do *Bacillus cereus* contém bactérias mesófilas e psicrótróficas de grande relevância quanto a deterioração de alimentos. A principal enzima responsável por essa deterioração é a *neutral metallopeptidase*, a qual é codificada pelo gene *npr* e controlada pelo regulador pleitrópico *Plcr*. A identificação genômica do perfil psicrótrófico nestas é conferida pelo gene *cspa*. Com o objetivo de verificar as prevalências fenotípicas e genotípicas de características proteolíticas e psicrótróficas, foram isolados da cadeia produtiva de lácteos, identificados fenotipicamente e sequenciados genomicamente, microrganismos pertencentes ao grupo do *Bacillus cereus*. Obteve-se 69 isolados, de 466 amostras analisadas, sendo que o gene *npr* e fenótipo proteolítico estavam presentes em, respectivamente, 97,1% (67) e 92,7% (64) das amostras. O regulador pleitrópico *Plcr* estava presente em 88,4% (61), sendo que duas amostras que continham o gene *npr* não possuíam o mencionado regulador. A atividade psicrótrófica, fenotipicamente, foi evidenciada em apenas 0,6% (1) das amostras. Entretanto, o gene *cspa* foi encontrado em 100% (69) das amostras genomicamente, demonstrando-se uma possível interferência de outros fatores para expressão do fenótipo psicrótrófico. Diante da alta frequência encontrada de genes responsáveis pela produção e regulação de enzimas deteriorantes, torna-se fundamental a adoção de preceitos higiênicos na obtenção do leite, visto que a termoestabilidade de tais enzimas culminam com a perpetuação destas por toda a vida de prateleira do produto.

**Palavras-chave:** biologia molecular, genômica, microbiologia, proteólise

## 1. INTRODUÇÃO

As bactérias pertencentes ao grupo do *Bacillus cereus*, também denominados *Bacillus cereus sensu lato (s.l.)* são amplamente distribuídas na natureza, sendo importantes agentes deteriorantes de alimentos (MILLER et al., 2018). São encontrados em diversos locais, sendo a indústria de laticínios como um dos mais recorrentes habitados (CATTANI et al., 2016). Em consequência da capacidade formadora de esporos, são comumente isolados em produtos lácteos acabados e prontos para o consumo (TIRLONI et al., 2017; VIDAL et al., 2016; HWANG; PARK, 2015).

Dentre os aspectos que o tornam um importante agente deteriorante, está a habilidade de síntese de metaloproteinases. Diversas são as metaloproteinases produzidas pelo *Bacillus cereus s.l.* Entretanto, a principal enzima proteolítica e utilizada como referência para aferição do potencial deteriorante é a *neutral metallopeptidase* (MONTANHINI et al., 2013).

As metaloproteinases são sintetizadas pelas bactérias do grupo, sendo o *Bacillus cereus sensu stricto (s.s.)* um dos principais produtores (MURUGAN; VILLI, 2009). Essas enzimas, as quais são termorresistentes, atuam sobre a caseína, causando a ruptura da ligação peptídica entre os aminoácidos fenilalanina e a metionina da cadeia peptídica da kappa-caseína e causando a desestabilização da micela (GARCÍA-ROMERO; MAYORGA-LLERENA, 2015), podendo resultar em precipitação proteica e com uma consequente diminuição do tempo de prateleira dos produtos lácteos, sendo um dos principais problemas tecnológicos que preocupam as empresas processadoras de leite (DOLL et al., 2017).

Um dos genes mais conservados no *Bacillus cereus s.s.* e constantemente utilizado como referência para detecção molecular de atividade proteolítica desta espécie é o gene *npr* (BACH et al., 2001). Estas enzimas são altamente influenciadas por fatores ambientais, como a temperatura (VON STETTEN; MAYR; SCHERER, 1999), e, portanto, possuindo diferentes ações em produtos lácteos dependendo da forma e tempo que forem estocados.

A presença de um gene no material genético de um microrganismo, não resulta, necessariamente, na expressão da determinada característica.

Reguladores pleiotrópicos são responsáveis por controlar geneticamente, positiva e negativamente, a produção de diversas enzimas e fatores de virulência. Um dos principais reguladores pleiotrópicos presentes nas bactérias do grupo do *Bacillus cereus* é o *Plcr* (GOHAR et al., 2002). Nas bactérias do grupo, estima-se que ele seja responsável pelo controle de ao menos 15 genes, tendo controle sobre enzimas deteriorantes (metaloproteinases e fosfolipases), fatores de formação de biofilmes e de toxinas causadoras da síndrome diarréica (LINDBACK et al., 2004).

A produção e perpetuação de metaloproteinases são dependentes de alguns fatores ambientais. Um dos mais importantes são concentrações adequadas de Cálcio no local onde as mesmas se encontram. Este possibilita que algumas enzimas sejam ativadas após serem sintetizadas, além de contribuir com a estabilidade térmica das enzimas deteriorantes (GHORBEL-FRIKHA et al., 2005). Assim, associando níveis de Cálcio elevados com disponibilidade de outros nutrientes necessários, o leite possui todos os requisitos adequados para a multiplicação do *Bacillus cereus* e síntese de metaloproteinases, sendo um ambiente totalmente favorável a ação destas, variando a manutenção de sua termoestabilidade de 26 a 100%, de acordo com o tempo de aquecimento (GHORBEL-FRIKHA et al., 2005).

Em relação a habilidade em multiplicar-se em temperaturas de refrigeração, diversos fatores possuem influência sobre esta. Um dos genes considerados como responsáveis por essa característica é o *cspa* (MONTANHINI et al., 2013). Entretanto, outros fatores podem interferir nesta característica, os quais ainda não estão elucidados completamente.

Diante do exposto, o presente estudo tem como objetivo isolar *Bacillus cereus* s.s. ao longo da cadeia produtiva do leite e derivados lácteos e verificar fenotípica e genotipicamente a presença da característica proteolítica de *Bacillus cereus* s.s., assim como o gene *cspa* que, de acordo com a literatura, é um dos principais indutores da característica psicrotófica ao *Bacillus cereus* s.s.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Obtenção das amostras**

Entre julho e novembro de 2016, foram obtidas 466 amostras da cadeia produtiva de leite, sendo 331 amostras oriundas de 26 propriedades leiteiras, 58 amostras de laticínios e 77 amostras de derivados lácteos comerciais obtidos no comércio varejista no município de Pirassununga, Estado de São Paulo, Brasil. Para a coleta das amostras, em superfícies foram utilizados suabes e realizado esfregaço utilizando-se moldes com área de 10cm<sup>2</sup>. Para o leite, utilizou-se frascos estéreis com capacidade de 50mL, volume este igual ao coletado.

### **Isolamento bacteriano e testes bioquímicos**

O pré-enriquecimento das amostras foi realizado utilizando Caldo Triptona de Soja (TSB) (Oxoid, Hampshire, UK) enriquecido com Polimixina B (20µg/mL) (STADHOUDERS, 1992), sendo a incubação realizada a 30°C durante 24 horas. Posteriormente, as amostras foram transferidas para placas contendo Ágar Manitol Gema de Ovo enriquecido com Polimixina B (MOSSEL; KOOPMAN; JONGERIUS, 1967) através da técnica de esgotamento e incubadas a 30°C durante 24 a 48 horas. Três a cinco colônias sugestivas foram transferidas para tubos inclinados contendo Ágar Triptona de Soja (Oxoid, Hampshire, UK) e incubadas durante 24 horas a 30°C.

Essas colônias foram caracterizadas através da coloração de Gram e testes bioquímicos. Os isolados classificados como *B. cereus* s.s. foram aqueles que apresentaram as seguintes características bioquímicas: catalase (+), fermentação da glicose (+), Voges-Proskauer (+), crescimento rizoide (-), hemólise de sangue de carneiro (+), produção de cristais (-), motilidade (+/-) e redução do nitrato a nitrito (+/-) (MACFADIN, 1976; SHARIF; ALAEDDINOGLU, 1988 ; APHA, 2001).

### **Caracterização fenotípica da atividade proteolítica**

A partir dos isolados confirmados bioquimicamente de *Bacillus cereus* s.s., foram realizadas diluições decimais sucessivas, até  $10^{-5}$ , para aumentar a possibilidade de obtenção de colônias isoladas. Posteriormente, foi inoculado 0,1 mL das diluições em Ágar Leite (agar padrão acrescido de 1% de leite em pó desnatado), com incubação a 30 °C por 48 horas (BEERENS; LUQUET, 1990). As colônias que possuíam halo transparente ao redor foram consideradas proteolíticas.

### **Caracterização fenotípica de cepas psicotróficas**

Para a visualização da característica psicotrófica, foram inoculadas alíquotas de leite (10µL) contaminado em Ágar Padrão para Contagem (PCA), em duplicata, e submetidas a incubação a 7°C, durante 10 dias. Após o período de incubação, as colônias foram contadas para expressão dos resultados utilizando o limite de contagem de 25 a 250 UFC por placa (SILVA et al., 2010).

### **Caracterização genotípica da atividade proteolítica e psicotrófica**

#### **Extração do DNA**

Utilizando-se uma alça de níquel cromo, as bactérias contidas em tubos com Ágar Soja Triptona (TSA) foram transferidas para tubos contendo Caldo Soja Tripticaseína (TSB) e incubadas a 30°C durante 24 horas. Após decorrido o tempo, foram transferidos 1,5 mL da cultura para tubos tipo eppendorf para realização da extração do DNA utilizando o Kit GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) de acordo com as instruções do fabricante para bactérias Gram positivas. A qualidade e concentração do DNA extraído foram avaliadas por espectrofotometria em sistema Nanodrop.

## Sequenciamento genômico e abordagem gene a gene

As bibliotecas de DNA (libraries) foram preparadas utilizando Illumina Nextera® XT Library Prep Kit (v3) de acordo com o protocolo do fabricante. Tal processo envolve a fragmentação de 1 µg de DNA genômica pela fragmentação enzimática, ligação de adaptadores nas porções finais dos fragmentos e a realização da PCR utilizando o conjunto de primers Illumina 3 primer set. AMPure® XP esferas paramagneticas (paramagnetic beads) (Beckman Coulter, Inc., USA) foram utilizadas para realizar a limpeza do DNA depois de cada etapa para remoção de pequenos fragmentos de DNA. As bibliotecas foram então normalizadas para o sequenciamento no aparelho Illumina MiSeq.

As sequências contíguas (contigs) foram montadas utilizando o SPAdes (BANKEVICH et al., 2012). Os genes individuais foram alinhados à cepa referência de *B. cereus* (ATCC 14579) utilizando os parâmetros padrões de BLAST da plataforma BIGSdb (JOLLEY; MAIDEN, 2010). O algoritmo BLAST foi utilizado para escanear todos os genomas para os genes ortólogos em cada locus do genoma de referência. Um ortólogo foi definido utilizando identidade superior a 70% e 50% de alinhamento do comprimento do fragmento. O software MAFFT foi utilizado para alinhar os genes ortólogos em uma abordagem gene a gene, e essas informações foram concatenadas em sequências contíguas para o genoma de cada isolado (SHEPPARD et al., 2013). A descoberta de genes, exportação das sequências e alinhamentos gene a gene foram realizados através do MUSCLE (EDGAR, 2004). Foi investigada a presença dos genes, os quais são altamente conservados e serve como referência para identificação de cepas proteolíticas e psicrotróficas, respectivamente (MONTANHINI et al., 2013).

Após o sequenciamento, a árvore filogenética foi elaborada utilizando a técnica de agrupamento *Neighbor joining*, a qual foi realizada através do rapidnj - Bioinformatics Research Centre - (<http://birc.au.dk/software/rapidnj>) incluindo os isolados obtidos, no presente estudo, da cadeia do leite e derivados lácteos e 193 cepas do grupo do *B. cereus*, os quais estão depositados no BIGSdb. Os isolados obtidos também foram classificados entre os sete grupos filogenéticos propostos por Guinebretiére et al. (2008) de acordo com a sequência do gene

*panC* através da ferramenta online (<https://www.tools.symprevius.org/Bcereus/english.php>).

Os dados do sequenciamento genômico dos isolados obtidos na cadeia produtiva de leite e derivados lácteos (Documento Suplementar 1) estão depositados no NCBI GenBank e Short Read Archive (SRA) associado ao BioProjeto: PRJNA390851. Os genomas também estão disponíveis no FigShare (10.6084/m9.figshare.5120020). Os detalhes completos e os números de acesso individuais dos isolados utilizados como população background podem ser encontrados no Documento Suplementar 2.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em 69 amostras, das 466, o *Bacillus cereus* s.s. foi isolado, os quais foram confirmados fenotípica e bioquimicamente como sendo pertencente ao grupo do *Bacillus cereus* e, posteriormente, comprovados por sequenciamento genômico. Nas demais 397 amostras, o isolamento não foi possível, pois as colônias apresentaram-se contaminadas com outros microrganismos. Pelo fato do *Bacillus cereus* s.s. não ser um bom competidor na presença de outros microrganismos, não houve a possibilidade de purificação do isolado.

Do total de isolados, 38 foram obtidos de 26 propriedades leiteiras localizadas na Região de Pirassununga-SP, onde foram obtidos isolados de superfícies de tanques de resfriamento (7), balde para ordenha manual (1), latões de leite (5), tubulações de equipamentos de ordenha (4), teteiras (5) e outros equipamentos e utensílios (10) utilizados na obtenção do leite, e ainda, amostras de leite cru (6). Outros 9 isolados foram obtidos em dois laticínios distintos, oriundos da mangueira do caminhão utilizado para transporte do leite (2), equipamentos (3), tubulações de leite (1) e utensílios utilizados durante o processamento (3). As amostras foram coletadas através de materiais estéreis, utilizando-se de suabes, quando se tratava de superfícies, e frascos para as amostras de leite cru. Os demais 22 isolados foram obtidos de derivados lácteos comerciais disponíveis em varejo, como queijo Minas frescal (1), bebida láctea UAT (1), creme preparado com queijo (1), cappuccino instantâneo (1) e

queijos fundidos tipo requeijão (18), os quais foram amostrados de marcas aleatórias.

De acordo com a classificação proposta Guinebretiére et al. (2008), os isolados obtidos a partir de leite cru, amostras de tanques de resfriamento, equipamentos e utensílios, os quais tiveram contato com leite, estão distribuídos nos grupos filogenéticos II, III, IV, V e VI. Em proporção maior, os derivados lácteos prontos para consumo foram agrupados, preferencialmente, no grupo filogenético III. Tal grupo é apontado como sendo o de maior risco em desencadear doenças transmitidas por alimentos (GUINEBRETIERE et al., 2008). Comumente, os isolados pertencentes desse grupo são citotóxicos, sendo que alguns desses possuem elevada citotoxicidade, representando risco à saúde pública (GUINEBRETIERE et al., 2010). Apenas um isolado foi considerado pertencente ao grupo filogenético VI, o qual possui a capacidade de multiplicação em temperaturas de refrigeração, podendo tornar-se um importante agente deteriorante em produtos refrigerados, tal qual, a diversos derivados lácteos.

Entretanto, outros métodos de caracterização genômica de isolados psicrotróficos são descritos na literatura científica. De acordo com FRANCIS et al. (1998), a presença do gene *cspa* confere ao *B. cereus* a capacidade de sobreviver e multiplicar-se em baixas temperaturas, o qual contribui para a existência de ribossomos capazes de codificar o mRNA em proteínas, mesmo em baixas temperaturas (CARLIN et al., 2010).

A resistência térmica de cepas psicrotróficas de bactérias do grupo do *Bacillus cereus* confere maior representatividade deste microrganismo em relação ao total de psicrotróficos presentes nos produtos lácteos após o processamento térmico (MONTANHINI et al., 2014), o que os torna potenciais deteriorantes proteicos durante o tempo de prateleira do produto e sendo de fundamental importância o conhecimento desta característica para a indústria leiteira.

No presente estudo, a prevalência do gene *cspa*, o qual de acordo com algumas pesquisas confere a capacidade psicrotrófica, foi de 100%, estando assim distribuídos ao longo de toda a cadeia produtiva do leite. Dos 69



isolados, 43,47% foram obtidos de produtos refrigerados (queijo tipo Minas frescal, bebida láctea UAT, creme preparado com queijo e queijos fundidos tipo requeijão), sendo que, em todos os isolados foi observada a presença do gene *cspa*. Entretanto, quando analisados fenotipicamente, os mesmos não se comportaram como psicrotrófico, ou seja, não foi observada a multiplicação destes em temperaturas de refrigeração.

Em trabalho semelhante, Montanhini et al., (2013) encontraram o gene *cspa* em 39,7% dos isolados, sendo que nenhum destes se comportou fenotipicamente como psicrotrófico. Von Stetten et al. (1999) confirmaram que a expressão do gene *cspa* é influenciada diretamente pelas condições climáticas onde o isolado foi obtido, o que pode explicar a não expressão da característica psicrotrófica apesar da presença do referido gene nos isolados do presente estudo.

Em relação à avaliação fenotípica proteolítica, foi observado que 92,75% (64) dos isolados possuíam tal característica, sendo estas distribuídas ao longo de toda a cadeia de produção do leite, estendendo-se até o varejo, sendo que estas estão reunidas, em sua maioria, nos grupos filogenéticos II a VI. Quando verificados apenas os derivados termicamente tratados (queijo Minas frescal, bebida láctea UAT, creme preparado com queijo, cappuccino instantâneo e queijos fundidos tipo requeijão), a prevalência fenotípica proteolítica dos mesmos é de 100%.

Montanhini et al. (2013) encontraram em todas as cepas analisadas (74) comportamento proteolítico. Tais cepas foram obtidas de leites submetidos a Ultra Alta Temperatura (UAT), pasteurização e desidratação, em consonância com o presente estudo. Ainda, os resultados obtidos pelos referidos autores citam as temperaturas de 27° a 37°C, como sendo as mais adequadas para a expressão fenotípica da proteólise, não havendo diferença entre estas.

Molva, Sudagidan e Okuklu (2009) analisaram queijos comercializados em diversas regiões da Turquia e isolaram bactérias do grupo do *Bacillus cereus*. Do total de isolados (100), 91% apresentaram atividade proteolítica originária de enzimas deteriorantes, resultado este semelhante ao do presente estudo. A presença destas afeta negativamente a qualidade do produto durante

o tempo de prateleira do mesmo, visto que mesmo depois de tratados termicamente, tais enzimas permanecem em intensa atividade (ARSLAN et al., 2014).

Diferentemente do presente trabalho por utilizar cepas laboratoriais, ou seja, cultivadas por longo tempo em ambientes livres de competição e em condições ideais, Arslan, Eyi e Küçüksari (2014) também encontraram atividade proteolítica em 100% (27) das cepas do grupo do *Bacillus cereus* analisadas. Tais resultados sugerem que independentemente do local de onde a bactéria foi obtida, a prevalência do comportamento proteolítico é semelhante.

Anteriormente, Cosentino et al. (1997) haviam sugerido que as enzimas do *Bacillus cereus* possuíam comportamento altamente proteolítico e deteriorante. Posteriormente, utilizando-se a metodologia elaborada por Polychroniadou (1988), De Jonghe et al. (2010) confirmaram o mencionado, analisando o potencial deteriorante de dez grupos bacterianos isolados de leite cru obtidos em dez fazendas (sendo cinco delas produtoras de leite orgânico). Ao fim, concluíram que as bactérias do grupo do *Bacillus cereus* foram as que demonstraram maior intensidade de atividade proteolítica, dando assim, ênfase ao controle dessas bactérias e denotando a importância dessas nos problemas tecnológicos pós-processamento devido a sua termoresistência.

O gene de referência para estudo genotípico de atividade proteolítica é o *npr*. A prevalência do gene *npr* (genótipo) e da atividade proteolítica em placa (fenótipo) são exibidas na Tabela 1.

Tabela 1. Prevalência do gene *npr*, característica proteolítica e o regulador *Plcr* em isolados do grupo do *B. cereus* obtidos de amostras de equipamentos e utensílios, em leite cru ou tanque de expansão e em amostras de derivados lácteos, no município de Pirassununga, Estado de São Paulo, em 2016.

	Equipamentos/ Utensílios			Leite cru/Tanque de expansão			Derivados lácteos			Total		
	p	n	Pv (%)	p	n	Pv (%)	p	n	Pv (%)	p	n	Pv (%)
<b>Genótipo (<i>npr</i>)</b>	34	34	100	13	13	100	20	22	90,9	67	69	97,1
<b>Fenótipo Proteolítico</b>	33	34	97,0	12	13	92,3	19	22	86,4	64	69	92,7
<b><i>Plcr</i></b>	32	34	94,1	11	13	84,6	18	22	81,8	61	69	88,4

p = positivos n = total Pv= prevalência

Aplicando-se o Teste exato de Fisher ( $p > 0,01$ ), demonstrou-se que a distribuição da presença do gene *npr* e da expressão fenotípica proteolítica está igualmente distribuída em todas as etapas da produção de leite e derivados lácteos.

Conforme exposto, a prevalência do gene *npr* foi de 100%, 100% e 90,9% em, respectivamente, leite cru, equipamentos que tiveram contato com este e derivados lácteos, resultando em uma prevalência total de 97,1%. Como verificado, a ampla distribuição das bactérias do grupo do *Bacillus cereus* adicionada a prevalência alta do gene referência produtor de enzimas proteolíticas, reflete a importância no controle da contaminação inicial do produto, uma vez que devido a sua resistência térmica (MERZOUGUI et al., 2014), aliada a sua capacidade de formação de biofilmes (OKSHEVSKY et al., 2017), possuem uma perpetuação na cadeia produtiva de lácteos.

Entretanto, a não visualização de atividade proteolítica fenotípica em placas em dois isolados que comprovadamente possuíam o gene de referência *npr* deve ser mais estudado com a finalidade de obter possíveis motivos pela não expressão da mencionada característica. Salienta-se que foram derivados lácteos que receberam algum tipo de tratamento térmico, podendo estes interferirem, devido à adversidade térmica os quais foram submetidos, na expressão da característica cujo referido gene codifica, ou nos reguladores destes.

A presença do gene *Plcr* foi constatada no sequenciamento genômico dos isolados em 94,1%, 84,6% e 81,8%, respectivamente em equipamentos e utensílios, leite cru e tanque de expansão, e derivados lácteos. Igualmente, não foi constatada diferenças significativas, de acordo com o Teste exato de Fisher ( $p > 0,01$ ), na distribuição do referido gene, independente do local de obtenção do isolado. Todas as amostras que possuíam o gene *Plcr* (61), também possuíam o gene *npr* (61), sendo que as duas amostras das quais não possuíam o gene *npr*, também estavam ausentes quanto a presença do *Plcr*, o que pode indicar a regulação por outros genes a serem elucidados.

## **CONCLUSÃO**

Os isolados apresentaram o gene de referência *npr*, mas nem todos expressaram fenotipicamente comportamento proteolítico, demonstrando a possibilidade de outros genes codificarem metaloproteínas. O gene *cspa*, característico de cepas psicrotróficas, estava presente nos isolados, entretanto, não expressaram tal comportamento, sugerindo assim a existência de interferência de outros fatores para a expressão do fenótipo. Diante da alta frequência encontrada de genes responsáveis pela produção e regulação de enzimas deteriorantes, a obtenção higiênica do leite torna-se fundamental vislumbrando a produção de leite e derivados de qualidade.

## **AGRADECIMENTOS**

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo 2015 /20874-0).

## REFERÊNCIAS

APHA – AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Committee on Microbiological for Foods. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4.ed.Washington: **American. Public Health Association**, 2001.

ARSLAN, S., EYI, A.; KÜÇÜKSARI, R. Toxigenic genes, spoilage potential, and antimicrobial resistance of *Bacillus cereus* group strains from ice cream. **Anaerobe**, v. 25, p. 42-46, 2014

BACH, H. J.; HARTMANN, A.; SCHLOTTER, M.; MUNCH, J. C. PCR primers and functional probes for amplification and detection of bacterial genes for extracellular peptidases in single strains and in soil. **Journal of Microbiological Methods**. v. 44, p. 173–182, 2001.

BEERENS, H.; LUQUET, F.M. Guía practico para el análisis microbiológico de la leche y los productos lácteos. **Editorial Acríbia**. p. 141, 1990.

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.

CATTANI, F.; BARTH, V. C.; NASÁRIO, J. S.; FERREIRA, C. A.; OLIVEIRA, S. D. Detection and quantification of viable *Bacillus cereus* group species in milk by propidium monoazide quantitative real-time pcr. **Journal of dairy science**, v. 99, p. 2617-2624, 2016.

COSENTINO, S.; MULARGIA, A. F.; PISANO, B.; TUVERI, P.; PALMAS, F. Incidence and biochemical characteristics of *Bacillus* flora in Sardinian dairy products. **International journal of food microbiology**. v. 38, p. 235-238, 1997.

DE JONGHE V., COOREVITS A., DE BLOCK J., VAN COILLIE E., GRIJSPEERDT K., HERMAN L. Toxinogenic and spoilage potential of aerobic

spore-formers isolated from raw milk. *Int. Journal of Food Microbiology*. v. 136 p. 318–32, 2010

DOLL, E. V.; SCHERER, S.; WENNING, M. Spoilage of microfiltered and pasteurized extended shelf life milk is mainly induced by psychrotolerant spore-forming bacteria that often originate from recontamination. *Frontiers in microbiology*. v. 8, p. 135, 2017.

EDGAR, R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high 1072 through ut. *Nucleic Acids Research*. v. 32, p. 1792-1797, 2004.

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

GARCÍA-ROMERO, A.; MAYORGA-LLERENA, E. Correlación de glicomacropéptido de lacto suero dulce con proteasas de bacterias psicrótrofas e identificación de leche adulterada. *Anais X Congreso de ciencia y tecnología Espe*, 2015.

GHORBEL-FRIKHA, B.; SELLAMI-KAMOUN, A.; FAKHFAKH, N.; HADDAR, A.; MANNI, L.; NASRI, M. Production and purification of a calcium-dependent protease from *Bacillus cereus* BG1. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. v. 32, p. 186-194, 2005.

GOHAR, M.; ØKSTAD, O. A.; GILOIS, N.; SANCHIS, V.; LERECLUS, D. Two-dimensional electrophoresis analysis of the extracellular proteome of *Bacillus cereus* reveals the importance of the PlcR regulon. *Proteomics*, v. 2, p. 784-791, 2002.

GUINEBRETIERE, M. H.; VELGE, P.; COUVERT, O.; CARLIN, F.; DEBUYSER, L.; NGUYEN-THE, C. The food poisoning power of *Bacillus cereus* Group strains varies according to phylogenetic affiliation (groups I-VII), not to species affiliation. *Journal of Clinical Microbiology*, p. 3388-3391, 2010.

GUINEBRETIERE, M. H.; THOMPSON, F. L.; SOROKIN, A.; NORMAND, P.; DAWYNDT, P.; EHLING-SCHULZ, M.; DE VOS, P. Ecological diversification in the *Bacillus cereus* group. **Environmental Microbiology**, v. 10(4), p. 851-865, 2008.

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

JOLLEY, K. A.; MAIDEN, M. C. BIGSdb: Scalable analysis of bacterial genome variation at the population level. **BMC Bioinformatics**, v. 11, p. 595, 2010.

LINDBÄCK, T.; FAGERLUND, A., RODLANDT, M. S.; GRANUM, P. E. Characterization of the *Bacillus cereus* Nhe enterotoxin. **Microbiology**, v. 150, p. 3959-3967, 2004.

MACFADIN, J. F. Biochemical tests for identification of medical bacteria. Baltimore: **The Willians & Willians**, p. 312, 1976.

MERZOUGUI, S.; LKHIDER, M.; GROSSET, N.; GAUTIER, M.; COHEN, N. Prevalence, PFGE typing, and antibiotic resistance of *Bacillus cereus* group isolated from food in Morocco. **Foodborne pathogens and disease**. v. 11, p. 145-149, 2014.

MILLER, R. A.; JIAN, J.; BENO, S. M.; WIEDMANN, M.; KOVAC, J. Genomic and phenotypic characterization of type strains and dairy-associated isolates in the *Bacillus cereus* group indicates considerable intra-clade variability in toxin production and cytotoxicity. **Applied and environmental microbiology**, AEM-02479, 2018

MOLVA, C.; SUDAGIDAN, M.; OKUKLU, B. Extracellular enzyme production and enterotoxigenic gene profiles of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains isolated from cheese in Turkey. **Food Control**. v. 20(9), p. 829-834, 2009.

MONTANHINI, M. T. M.; NETO, R. M.; BITTENCOURT, J. V. M.; PINTO, J. P. D. A.; BERSOT, L. D. S. Evaluation of the psychrotrophic specific signatures for cspA gene and 16S rDNA on the phenotype of *Bacillus cereus sensu strictu*. **International Journal of Dairy Technology**. v. 67(1), p. 67-72, 2014.

MONTANHINI, M. T. M.; COLOMBO, M.; NERO, L. A.; BERSOT, L. S. Presence of neutral metallopeptidase (npr) gene and proteolytic activity of *Bacillus cereus* isolated from dairy products. **Journal of dairy science**, v. 96, p. 5641-5643, 2013.

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.

MURUGAN, B.; VILLI, R. A. Lipolytic activity of *Bacillus* species isolated from milk and dairy products. **The Indian Veterinary Journal**. v. 86, p. 80-81, 2009.

OKSHEVSKY, M.; LOUW, M. G.; LAMELA, E. O.; NILSSON, M.; TOLKER-NIELSEN, T.; MEYER, R. L. A transposon mutant library of *Bacillus cereus* ATCC 10987 reveals novel genes required for biofilm formation and implicates motility as an important factor for pellicle-biofilm formation. **Microbiology Open**, 2017.

POLYCHRONIADOU, A. A simple procedure using trinitrobenzenesulphonic acid for monitoring proteolysis in cheese. **Journal of Dairy Research**. v. 55, p. 585–596, 1988.

SHARIF, F. A.; ALAEDDINOĞLU, N. G. A rapid and simple method for staining of the crystal protein of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**. v. 3(4), p. 227-229, 1988.

SHEPPARD, S. K.; JOLLEY, K. A.; MAIDEN, M. C. A gene-by-gene approach to bacterial population genomics: whole genome MLST of *Campylobacter*. **Genes**. v. 3(2), p. 261-277, 2012.

STADHOUDERS, J. The enumeration of spores and vegetative cells of *Bacillus cereus*. Bull. **IDF.**, v. 275, p. 15-18, 1992.



TIRLONI, E.; GHELARDI, E.; CELANDRONI, F.; BERNARDI, C.; STELLA, S. Effect of dairy product environment on the growth of *Bacillus cereus*. **Journal of Dairy Science**, v. 100(9), p. 7026-7034, 2017.

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

VON 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, p. 503–515, 1999.

WANG, J.; DING, T.; OH, D. H. Effect of temperatures on the growth, toxin production, and heat resistance of *Bacillus cereus* in cooked rice. **Foodborne pathogens and disease**, v. 11, p. 133-137, 2014.

**CAPÍTULO 3 – AVALIAÇÃO DA PROTEÓLISE DA KAPPA-CASEÍNA AO LONGO DO TEMPO DE PRATELEIRA DE LEITE PASTEURIZADO CONTAMINADO EXPERIMENTALMENTE COM *Bacillus cereus sensu stricto***

**RESUMO** – O *Bacillus cereus* é uma das bactérias mais importantes no que tange a deterioração de alimentos prontos para consumo. Este é responsável pela síntese de enzimas lipolíticas e proteolíticas, o que gera um grande problema para as indústrias processadoras de leite devido a *recall* de produtos com defeitos tecnológicos. O objetivo do presente trabalho foi de avaliar a proteólise da kappa-caseína, ocasionada por metaloproteinasas secretadas por *B. cereus* s.s., em leite pasteurizado ao longo do tempo de prateleira. Para tal, o leite utilizado foi submetido ao processo de tindalização objetivando a eliminação de microbiota contaminante. Posteriormente foi contaminado com *B. cereus* s.s., os quais foram confirmados como proteolíticos através de sequenciamento genômico e fenotipagem, e em seguida submetidos á pasteurização, envasados e armazenados sob refrigeração, sendo analisados a cada 5 dias pelo método da ninidrina ácida. As médias das concentrações de ácido siálico nos primeiros dias do leite pasteurizado (controle) e pasteurizado contaminado foram de 3,86 µg/mL e 3,99 µg/mL, respectivamente, e nos décimos dias, também na mesma ordem, de 4,19 µg/mL e 4,45 µg/mL. O aumento dos subprodutos da ação das metaloproteinasas ao longo do tempo de prateleira do produto demonstra a importância do controle do *Bacillus cereus*, o qual é um dos principais produtores destas, nas etapas iniciais da produção a fim de obter produtos de qualidade.

**Palavras-chave:** ácido siálico, metaloproteinasas, NANA, ninidrina ácida

## 1. INTRODUÇÃO

Em 2016, o Brasil produziu 33,6 bilhões de litros de leite e consolidou-se como o quarto maior produtor do mundo (FAO, 2018). Entretanto, apesar da grande produção, o consumo *per capita* de leite, (171 litros/ano) ainda fica abaixo do recomendado mundialmente (220 litros/ano) (VILELA et al., 2017). Visualizando tal cenário, o potencial de crescimento do mercado consumidor no país é grande. Contudo, a premissa por produtos de qualidade exigida pelos consumidores, requer dos laticínios medidas que minimizem problemas que ocasionam perdas, e dentre tais, as contaminações de origem microbiológica do leite (MARTELLO, 2017), das quais o *Bacillus cereus sensu lato* possui destaque.

Os *Bacillus cereus sensu lato* são comumente encontrados no leite cru (KABLE et al., 2016). Tal contaminação pode ocorrer na obtenção do produto, durante o transporte ou no interior da indústria processadora (PORCELLATO et al., 2018). Ainda, em consequência da habilidade em formar esporos, possui elevada resistência térmica, a qual o torna um dos principais desafios para a indústria de lácteos (LUCKING et al., 2013).

Outra importante característica presente no *Bacillus cereus sensu lato*, e causadora de importantes perdas em leite e derivados, é a capacidade de síntese e liberação de metaloproteinases. Tais enzimas atuam nas frações kappa, alfa e beta das micelas de caseína, sem que essa atividade degradante ocorra nas proteínas do soro (BÜRGER, 2015). Esse fato é um dos fatores que mais afeta o tempo de prateleira do leite e derivados, visto que a ação degradante das metaloproteinases não é interrompida, o que culmina com mudanças no sabor e textura do produto, derivados do aparecimento de peptídeos que possuem características de amargor, causando rejeições por parte dos consumidores (MARCHAND et al., 2017).

Salienta-se que as metaloproteinases produzidas por esse contaminante possuem elevada resistência térmica, mantendo-se íntegras e ativas após o tratamento térmico e durante todo o período de validade do produto, ocasionando grandes prejuízos econômicos decorrentes dessa atividade (IZIDORO et al., 2003).

Todavia, não é toda proteólise verificada no leite que advém de contaminações microbiológicas. A ação de proteases naturais do produto como a plasmina (WALSTRA, 1990) e a proteinase alcalina nativa, também podem igualmente desestabilizar a caseína resultando no aumento da viscosidade do produto, e em alguns casos, formação de geleificação no leite, principalmente em produtos de elevado período de prateleira (VIDAL-MARTINS, 2005).

O local de predileção de ação das proteases em geral encontra-se entre os aminoácidos fenilalanina e metionina da kappa-caseína, local este semelhante ao utilizado pela renina na coagulação do leite para a fabricação de queijos (GARCÍA-ROMERO; MAYORGA-LLERENA, 2015), resultando em duas porções distintas: a para-kappa-caseína e o (1-105) e o glicomacropéptido (106-169) (HARAGUCHI et al., 2006).

Sendo assim, a determinação do teor de glicomacropéptidos (GMP) está relacionada com a ocorrência desse processo que também é utilizado como base para a verificação de adição fraudulenta de soro ao leite (PRATA; PRATA, 2012). Metodologias que possuem o objetivo de mensurar a quantidade de GMP nas amostras constituem a base das análises desenvolvidas para detectar fraudes e atividade proteolítica no produto (OANCEA, 2009), como a polarografia, determinação do teor de fosfatídeos e de aminoácidos sulfurados, e mais comumente a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Entretanto a CLAE é considerada uma metodologia cara e demorada, ficando fora do alcance da maioria dos laboratórios (PRATA; PRATA, 2012).

Desta forma, em opção a CLAE, foi desenvolvido um dos métodos mais utilizados rotineiramente, o qual dispensa o emprego de equipamentos sofisticados, além de se obter de forma rápida os resultados (FUKUDA; RÖIG; PRATA, 2004). Tal método detecta presença de ácido siálico (NANA - N-acetyl Neuraminic Acid) na molécula de glicomacropéptido por meio da espectrofotometria em região visível do espectro. Em comparação com a CLAE, tal método demonstrou uma excelente correlação ( $r = 0,996$ ) (FUKUDA; RÖIG; PRATA, 2004), havendo assim, a possibilidade de um maior número de laboratórios poderem realizar tal ensaio.

Assim, o presente estudo possui o objetivo de avaliar a proteólise da kappa-caseína, ocasionada por metaloproteinases secretadas por *B. cereus* s.s., em leite pasteurizado, contaminado experimentalmente, ao longo do tempo de prateleira, assim como verificar a eficácia.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

O projeto foi executado no laticínio da prefeitura do Campus USP “Fernando Costa” e no Laboratório de Qualidade de Produtos de Origem Animal (Quali-POA) da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA/USP).

### **Tindalização do leite e avaliação de sua eficácia**

Para a execução do projeto, fez-se necessário a obtenção de um leite comprovadamente esterilizado. Para isso, fez-se uso do processo denominado tindalização. O leite cru refrigerado foi tindalizado, visando eliminar células vegetativas e esporos de bactérias a fim de reduzir a possibilidade da presença de microrganismos no leite e ocasionar interferência na análise dos resultados. Visando avaliar se o processo de tindalização atendia ao objetivo do projeto, foram efetuados testes prévios para verificar a eficácia deste processo. Foi adicionado um inóculo de *Bacillus cereus* s.s. contendo  $10^3$  UFC.ml<sup>-1</sup> ao leite e realizada a tindalização com três repetições e, posteriormente, feito teste de esterilidade em placas contendo Ágar Bacillus Cereus ou Ágar Manitol-Gema-De-Ovo-Polimixina (MYP) e incubadas a 30°C por 24 horas (MOSSEL; KOOPMAN; JONGERIUS, 1967; STADHOUDERS, 1992).

Anteriormente ao início da tindalização para a realização do estudo, foi realizada uma rigorosa higienização mecânica no equipamento (logurteira Mec Milk®) com Hidróxido de Sódio, Ácido Nítrico e Ácido Peracético. Após o procedimento, foram realizados swabes para a comprovação da eficiência da higienização. Sessenta litros de leite cru refrigerado foram colocados no equipamento e processados de acordo com Kim et al. (2012) modificado: aquecimento do leite a 80°C por 10 minutos, seguido por resfriamento, e

posterior incubação em a 30°C por 30 minutos para induzir a germinação, seguido por aquecimento a 95° por 20 minutos. Esse procedimento foi executado sucessivamente por três vezes, sendo que a cada processo foi coletado uma amostra para análise.

### **Contaminação experimental do leite tindalizado**

Para que o inóculo contendo a população de *Bacillus cereus* desejado fosse utilizado, foi inoculado 10 µL de cultura pura, a qual estava armazenada em BHI com glicerol, e efetuadas diluições sucessivas ( $10^0$  a  $10^{-10}$  UFC.ml<sup>-1</sup>) em água peptonada. Posteriormente, foi realizado esfregaço em Ágar Padrão para Contagem (PCA) com o auxílio de alças de Drigalski, e incubadas a 30°C por 24 horas (MOSSEL; KOOPMAN; JONGERIUS, 1967; STADHOUDERS, 1992). Assim, pode ser observado o volume ideal do inóculo para que o leite apresentasse a população requerida do microrganismo.

A contaminação experimental do leite foi realizada, adicionando-se 15mL de caldo Infusão Cérebro e Coração (BHI), para que ao fim da pasteurização, o produto apresentasse  $10^3$  UFC.mL<sup>-1</sup> do isolado de *B. cereus* s.s. (SAMN07414939 – Bioprojeto PRJNA390851), o qual era comprovadamente proteolítico devido à presença do gene *npr* e seu regulador pleiotrópico *Plcr*, além de fenotipicamente ter sido evidenciado a presença de halo proteolítico em placas contendo de ágar leite. A partir dessa etapa, o leite experimentalmente contaminado foi pasteurizado, envasado e mantido sob refrigeração (4°C) durante 10 dias, sendo coletadas amostras nos seguintes momentos: após a tindalização (Tindalizado - T), antes da pasteurização (Tindalizada e contaminada – TC), imediatamente após a pasteurização (Contaminada e Pasteurizada – CP), cinco dias em refrigeração (CPD+5) e 10 dias em refrigeração (CPD+10). Foram realizadas três repetições (R1, R2, R3) utilizando esse modelo experimental.

## **Contagem Populacional em Placas**

Foram contadas as colônias sugestivas de *Bacillus cereus* em todos os momentos descritos (T; TC; CP; CPD+5; CPD+10). Para isso, foram transferidas alíquotas de 0,1mL para Placas de Petri contendo Ágar Bacillus Cereus ou Ágar Manitol-Gema-De-Ovo-Polimixina (MYP) e incubadas a 30°C por 24 horas (MOSSEL; KOOPMAN; JONGERIUS, 1967; STADHOUDERS, 1992), para então ser realizada a contagem de colônias sugestivas.

## **Mensuração da NANA através da metodologia da Ninidrina Ácida**

Para a realização da metodologia da Ninidrina Ácida, os reagentes utilizados foram: ácido siálico/NANA (Sigma), Ninidrina (Sigma), Ácido Clorídrico P.A (Merck), Ácido Acético Glacial (Merck), Ácido Tricloroacético 24% (Merck), Ácido Fosfotúngstico (Nuclear), Etanol absoluto (Merck). A solução de ninidrina ácida foi feita adicionando-se 1g de ninidrina, 16 mL de Ácido Clorídrico PA e 24 mL de ácido acético glacial (estocada em frasco escuro, sob refrigeração) (FUKUDA; RÖIG; PRATA, 2004).

No laboratório Quali-POA, as amostras foram submetidas à análise, em duplicatas, para determinação do teor de GMP livre por meio de método espectrofotométrico na região visível (ANSM). Para isso, 15 mL de amostra de leite foram acrescidos, sob agitação, em 15 mL de solução de TCA a 24%. Após repouso de 30 minutos a mistura foi filtrada. Em duplicatas, 10 mL do filtrado foi depositado em tubos de centrífuga previamente tarados, adicionando-se 1 mL de solução de PTA a 20% (Ácido Fosfotúngstico). A mistura foi centrifugada a 2000g (3.500 rpm) por 10 minutos. O sobrenadante foi cuidadosamente descartado, evitando-se a perda do sedimento. O sedimento foi suspenso em 6 mL de etanol absoluto, seguido de nova centrifugação durante 10 minutos. Utilizando-se apenas o sedimento, a cada tubo foram adicionados 2 mL de ácido acético glacial e 1 mL do reagente de ninidrina ácida, homogeneizados e submetidos a banho-maria fervente por exatos 10 minutos. Na presença de glicomacropéptideo há desenvolvimento de cor variando do amarelo claro (dourado) ao marrom-amarelado (castanho escuro). Após o aquecimento a mistura foi resfriada em banho de água e gelo e

levada à leitura da absorbância a 470nm no equipamento Shimadzu UV1800, as quais foram transformadas em concentração (mg GMP/L) utilizando-se curva-padrão previamente elaborada (FUKUDA; RÖIG; PRATA, 2004). Foram efetuadas leituras do controle negativo e contaminadas experimentalmente no dia 0, 5 e 10, abrangendo assim todo o período de validade do produto.

A curva-padrão foi feita utilizando a mesma metodologia acima descrita, com diluição seriada de concentrações conhecidas de ácido siálico puro (Sigma) e em triplicata, foram determinados os pontos da curva-padrão (FUKUDA; RÖIG; PRATA, 2004).

### **Análise Estatística**

Para análise estatística dos dados, foram utilizados Anova e Teste de Tukey considerando o nível de significância ( $< 0,05$ ). Para isso, foi utilizado o software Assistat (SILVA, 2018).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A tinalização efetuada no leite com o objetivo de eliminar todos os microrganismos presentes no mesmo mostrou-se eficiente com três ciclos completos, respeitando-se o proposto por Kim et al. (2012). Os resultados da tinalização podem ser visualizados na Figura 1.



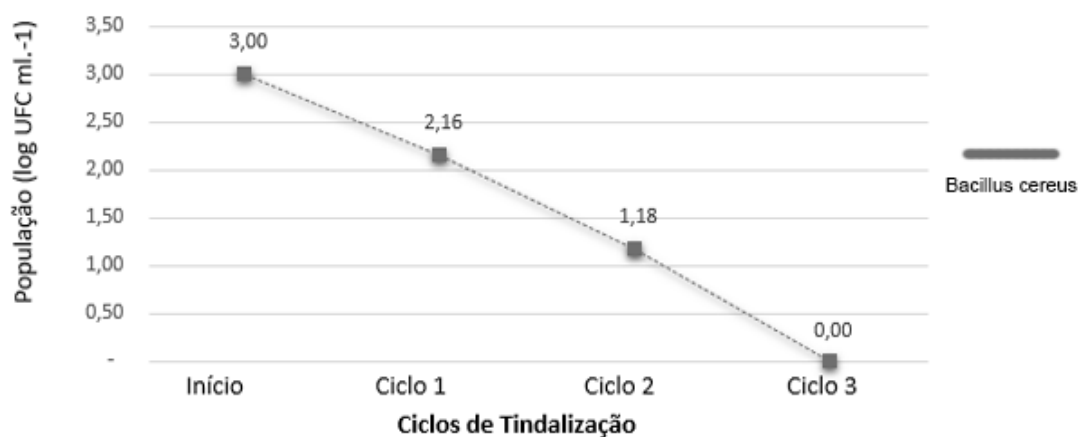


Figura 1. Contagens médias das populações de *B. cereus* em três repetições de tinalização de 60 litros de leite cru refrigerado, contaminado com  $10^3$  UFC.mL<sup>-1</sup>, de acordo com o protocolo de Kim et al. (2012) modificado, sendo cada repetição composta por 3 ciclos sequenciais.

A população média de microrganismos pertencentes ao grupo do *B. cereus* observada nas repetições de tinalização realizadas no presente estudo antes do início do primeiro ciclo foi de 3 log UFC.mL<sup>-1</sup>. Após o primeiro, segundo e terceiro ciclos, respectivamente, foram de 2,15; 1,18 e 0 log UFC.mL<sup>-1</sup>, respectivamente. No primeiro e segundo ciclos de tinalização, as reduções encontradas nas populações de bactérias do grupo do *B. cereus* foram de 0,85 log UFC.mL<sup>-1</sup> e 0,97 log UFC.mL<sup>-1</sup>, sendo que na última etapa do processo as populações bacterianas não foram detectadas, demonstrando sua eficácia.

Ainda, para que houvesse garantias de que o leite tinalizado estava livre de microrganismos, foram feitas análises microbiológicas, as quais foram negativas para a presença de qualquer microrganismo nas três repetições que se sucederam, o que permitiu que mencionado procedimento atendesse a demanda do presente estudo.

A tindalização é um procedimento pouco utilizado cientificamente e por isso há poucos estudos comparativos. Analisando a diminuição das populações de esporos de bactérias do grupo do *B. cereus* em um tipo de bebida de arroz vendida na Coréia, a redução encontrada quando aplicada um ciclo de tindalização foi de 4,9 log UFC (KIM et al., 2012), demonstrando a eficácia da metodologia utilizada.

A análise dos resultados obtidos do presente estudo permite concluir que houve uma eliminação das células vegetativas e esporos de bactérias do grupo do *B. cereus* no leite tindalizado ou no mínimo uma redução a níveis indetectáveis através do método utilizado, imediatamente após o processo, sendo tal protocolo adequado para utilização em estudos que necessitam obter um leite não contaminado com esses microrganismos para realização de contaminação experimental.

As médias de contagens populacionais nos três dias (CP, CPD+5 e CPD+10) podem ser observadas na Tabela 1.

Tabela 1. Médias das populações de *Bacillus cereus* s.s. proteolíticos em amostras de leite pasteurizado, contaminados experimentalmente, nos momentos CP, CPD+5 e CPD+10.

MÉDIAS DAS POPULAÇÕES DE <i>Bacillus cereus</i> s.s. – Log <sub>10</sub> UFC.mL <sup>-1</sup>												
	CP				CPD+5				CPD+10			
	L1	L2	$\bar{x}$	$\sigma$	L1	L2	$\bar{x}$	$\sigma$	L1	L2	$\bar{x}$	$\sigma$
<b>CONTROLE</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>REPETIÇÃO 1</b>	3,80	3,83	3,81	0,02	3,82	3,85	3,83	0,02	3,83	3,88	3,85	0,03
<b>REPETIÇÃO 2</b>	3,95	3,98	3,96	0,02	3,97	3,98	3,98	0,01	3,99	4,00	4,00	0,01
<b>REPETIÇÃO 3</b>	3,98	3,96	3,97	0,01	3,98	3,97	3,98	0,01	3,99	4,00	3,99	0,01

L1: leitura 1    L2: leitura 2     $\bar{x}$ : média     $\sigma$ : desvio padrão    CP: leite contaminado pasteurizado no dia zero  
 CPD+5: leite contaminado pasteurizado no dia cinco    CPD+10: leite contaminado pasteurizado no dia dez

Nas amostras TC, CP, CPD+5 e CPD+10 das três repetições (R1, R2 e R3) foi possível observar colônias características nas placas contendo ágar seletivo, demonstrando a sobrevivência do microrganismo ao processo de pasteurização rápida. As populações de *Bacillus cereus* s.s. nos controles negativos permaneceram indetectáveis durante todo o tempo de prateleira do

produto, comprovando assim a eficiência do processo, a qual já havia sido verificada em testes preliminares. Outros autores, ao aplicarem diferentes tratamentos térmicos dos utilizados rotineiramente nas indústrias, não obtiveram êxito na eliminação absoluta do *Bacillus cereus* nas amostras de leite testadas (DUMALISILE et al., 2005).

De acordo com Kim et al. (2012), além do intervalo entre os ciclos da tindalização estimularem a germinação das formas esporuladas, também ocasiona um aumento na susceptibilidade a eliminação térmica dos esporos sobreviventes, aumentando assim a chance de êxito na esterilização do produto.

Pesquisas clássicas referentes a métodos de eliminação de formas esporuladas de bactérias obtiveram resultados diferentes ao do presente estudo. Utilizando o mesmo princípio da tindalização, foi realizado um processo intitulado de dupla pasteurização, a qual continha um intervalo entre os processos, visando a germinação das formas esporuladas para a consequente eliminação destas no próximo ciclo de pasteurização. Entretanto, este processo não foi julgado adequado, tendo em vista os diferentes tempos de germinação das diferentes formas esporuladas presentes no leite, além de ser comercialmente inviável a realização do processo (FRANKLIN, 1969).

Ainda visando à eliminação de microrganismos esporulados, Brown, Willes e Prentice (1979) aplicaram, também, a metodologia de dupla pasteurização, o qual culminou com a sobrevivência de um elevado percentual de *Bacillus cereus* e *Bacillus subtiles*, demonstrando assim a ineficiência das metodologias aplicadas por eles. Talvez, a ineficácia obtida pelas pesquisas citadas seja decorrente de terem sido aplicados apenas dois tratamentos térmicos, visto que no presente estudo, caso tivesse sido aplicado o mesmo número, também não ocorreria a eliminação total dos microrganismos avaliados.

As curvas padrões foram realizadas a cada análise de glicomacropéptido (GMP) para minimizar possíveis erros. As leituras das curvas padrões nos três dias (CP, CPD+5 e CPD+10) podem ser observadas na Tabela 2.

Tabela 2. Leituras e médias das absorvâncias para constituição das curvas padrões, utilizando-se concentrações variáveis conhecidas de ácido siálico, nos momentos CP, CPD+5 e CPD+10.

Ácido siálico µg	Leitura Curva Padrão CP				Leitura Curva Padrão CPD+5				Leitura Curva Padrão CPD + 10			
	L1	L2	L3	$\bar{x}$	L1	L2	L3	$\bar{x}$	L1	L2	L3	$\bar{x}$
<b>0</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>9,8</b>	0,116	0,118	0,116	0,117	0,121	0,111	0,112	0,115	0,119	0,129	0,124	0,124
<b>19,6</b>	0,241	0,244	0,239	0,241	0,239	0,234	0,236	0,236	0,248	0,261	0,254	0,254
<b>29,4</b>	0,355	0,357	0,355	0,356	0,359	0,358	0,35	0,356	0,358	0,38	0,391	0,376
<b>39,2</b>	0,454	0,458	0,455	0,456	0,449	0,449	0,441	0,446	0,448	0,452	0,464	0,455
<b>49</b>	0,517	0,518	0,517	0,517	0,508	0,512	0,518	0,513	0,518	0,538	0,539	0,532
<b>58,8</b>	0,662	0,668	0,656	0,662	0,669	0,678	0,669	0,672	0,681	0,689	0,691	0,687
<b>68,6</b>	0,760	0,765	0,752	0,759	0,769	0,767	0,761	0,766	0,782	0,79	0,817	0,796
<b>78,4</b>	0,862	0,868	0,861	0,864	0,884	0,879	0,871	0,878	0,879	0,904	0,908	0,897
<b>88,2</b>	0,951	0,953	0,951	0,952	0,975	0,971	0,979	0,975	0,968	0,981	0,988	0,979
<b>98</b>	1,043	1,051	1,046	1,047	1,058	1,051	1,059	1,056	1,054	1,061	1,064	1,060

L1: leitura 1    L2: leitura 2     $\bar{x}$ : média    CP: leite contaminado pasteurizado no dia zero

CPD+5: leite contaminado pasteurizado no dia cinco    CPD+10: leite contaminado pasteurizado no dia dez

As absorvâncias encontradas nas curvas padrões no presente estudo são semelhantes as obtidas pelos autores que descreveram a metodologia inicialmente, sendo assim, consideradas dentro da aceitabilidade da proposta do corrente estudo. Pequenas variações são relatadas em alguns estudos devido ao manuseio, tipo de equipamento utilizado e o grau de pureza do ácido siálico (variável de 60% a 98%) utilizado na confecção da curva padrão (FUKUDA; RÖIG; PRATA, 2004).

Além dos fatores citados, uma possível interferência na absorvância pode ser derivada da metodologia de aquecimento dos reagentes, pré-leitura, a qual catalisa a reação e resultará na coloração que será lida pelo espectrofotômetro. Yao e Ubuka (1987) estipulam exatos 10 minutos de banho-maria fervente, ou seja, as soluções são colocadas no momento em que ocorre a fervura do mesmo. Outros autores, inseriram os tubos desde o início do aquecimento, elevando assim o tempo global de aquecimento (FUKUDA; RÖIG; PRATA, 2004).

As curvas padrões obtidas podem ser visualizadas na Figura 2.

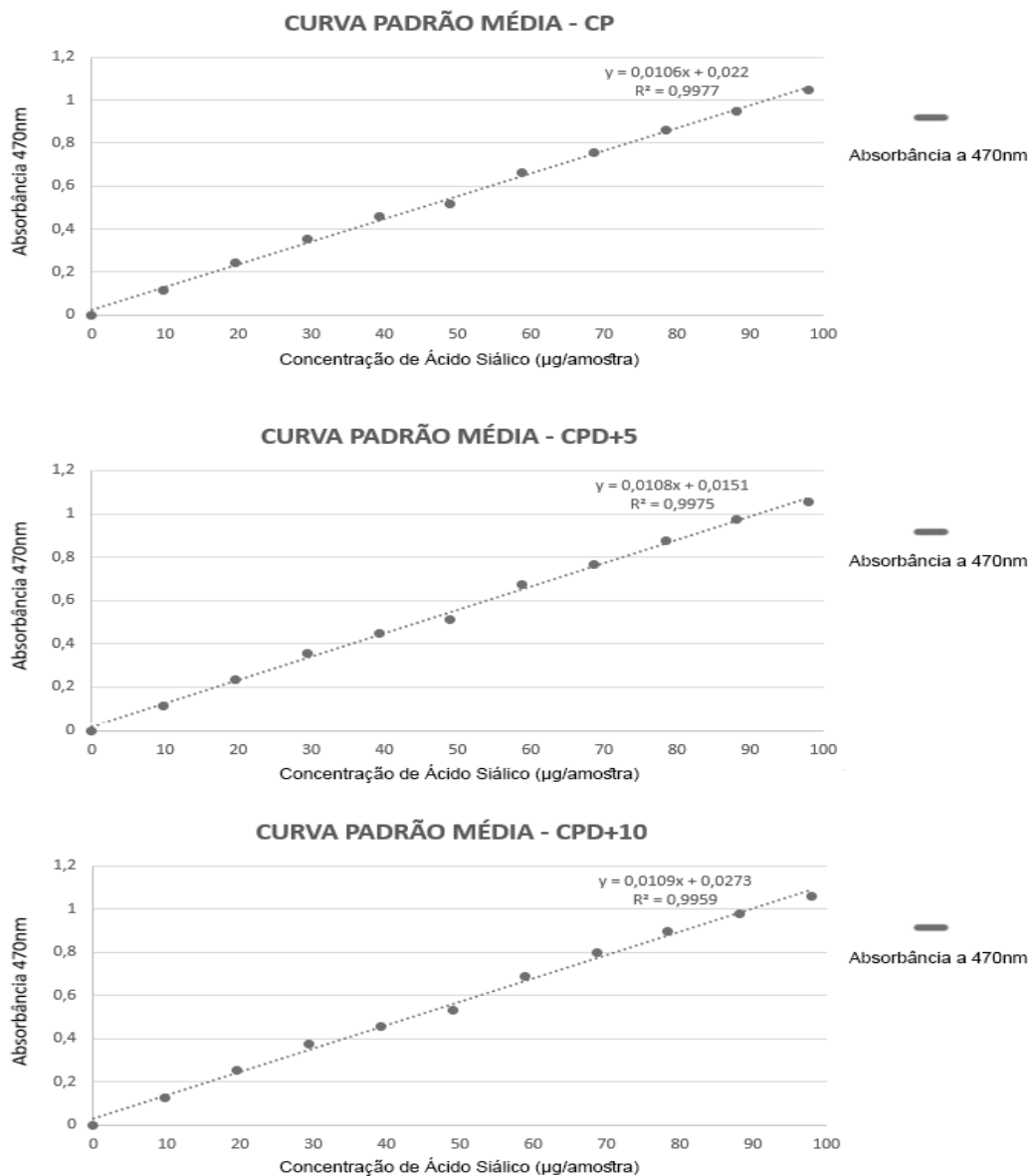


Figura 2. Curvas padrões, equações e coeficientes de correlação obtidos utilizando-se concentrações variáveis conhecidas de ácido siálico (pureza 95%), nos momentos CP, CPD+5 e CPD+10.

Os coeficientes de correlação obtidos nos momentos CP, CPD+5 e CPD+10 foram, respectivamente, 0,9977; 0,9975 e 0,9959. Tais números, de acordo ou superiores a outros trabalhos semelhantes (PRATA; PRATA, 2012; CLOSS; SOUZA, 2011; FUKUDA; RÖIG; PRATA, 2004), encontram-se dentro da faixa de aceitabilidade para esses coeficientes, não havendo assim, problemas na continuidade do presente estudo.

As absorvâncias lidas nos momentos CP, CPD+5 e CPD+10 e as concentrações de ácido siálico, encontradas utilizando-se as equações obtidas através das curvas padrões, estão presentes na Tabela 3 e Tabela 4, respectivamente.

Tabela 3. Leituras e médias das absorvâncias em amostras de leite pasteurizado, contaminados experimentalmente com *Bacillus cereus* s.s. proteolíticos, nos momentos CP, CPD+5 e CPD+10.

	ABSORVÂNCIA 470nm											
	CP				CPD+5				CPD+10			
	MIN	MAX	$\bar{x}$	$\sigma$	MIN	MAX	$\bar{x}$	$\sigma$	MIN	MAX	$\bar{x}$	$\sigma$
<b>CONTROLE</b>	0,225	0,228	0,227	0,002	0,231	0,238	0,235	0,005	0,258	0,254	0,256	0,003
<b>REPETIÇÃO 1</b>	0,229	0,230	0,230	0,001	0,238	0,249	0,244	0,008	0,269	0,259	0,264	0,007
<b>REPETIÇÃO 2</b>	0,232	0,230	0,231	0,001	0,248	0,253	0,251	0,004	0,268	0,264	0,266	0,003
<b>REPETIÇÃO 3</b>	0,239	0,242	0,241	0,002	0,258	0,263	0,261	0,004	0,284	0,279	0,281	0,004

L1: leitura 1    L2: leitura 2     $\bar{x}$ : média    CP: leite contaminado pasteurizado no dia zero  
 CPD+5: leite contaminado pasteurizado no dia cinco    CPD+10: leite contaminado pasteurizado no dia dez

Tabela 4. Concentrações e médias de ácido siálico em amostras de leite pasteurizado, contaminados experimentalmente com *Bacillus cereus* s.s. proteolíticos, nos momentos CP, CPD+5 e CPD+10.

	ÁCIDO SIÁLICO - $\mu\text{g/mL}$											
	CP				CPD+5				CPD+10			
	MIN	MAX	$\bar{x}$	$\sigma$	MIN	MAX	$\bar{x}$	$\sigma$	MIN	MAX	$\bar{x}$	$\sigma$
<b>CONTROLE</b>	3,83	3,88	3,86	0,04	4,00	4,13	4,06	0,09	4,23	4,15	4,19	0,06
<b>REPETIÇÃO 1</b>	3,90	3,92	3,91	0,01	4,13	4,33	4,23	0,14	4,43	4,24	4,34	0,13
<b>REPETIÇÃO 2</b>	3,96	3,92	3,94	0,03	4,31	4,41	4,36	0,07	4,41	4,34	4,37	0,05
<b>REPETIÇÃO 3</b>	4,09	4,15	4,12	0,04	4,50	4,59	4,54	0,06	4,70	4,61	4,66	0,06

L1: leitura 1    L2: leitura 2     $\bar{x}$ : média     $\sigma$ : desvio padrão    CP: leite contaminado pasteurizado no dia zero  
 CPD+5: leite contaminado pasteurizado no dia cinco    CPD+10: leite contaminado pasteurizado no dia dez

Através das absorvâncias lidas pelo espectrofotômetro, foram obtidas as concentrações de ácido siálico ( $\mu\text{g/mL}$ ) nas amostras nos momentos CP, CPD+5 e CPD+10. Apesar de observada uma diferença visual entre o controle e as repetições, estatisticamente essas diferenças não foram significativas quando aplicada a Análise de Variância ( $p > 0,05$ ). Entretanto, quando analisada as concentrações de ácido siálico ao longo do tempo de prateleira dentro de

um mesmo tratamento, foi observado aumento tanto na amostra controle quanto nas amostras experimentalmente contaminadas, sendo estas estaticamente significativas quando aplicada a Análise de Variância e Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

São escassos os trabalhos que utilizam leites pasteurizados para verificação de atividade proteolítica por metaloproteínases bacterianas. Em sua maioria, esses trabalhos utilizam produtos com tempos de prateleiras elevados, como o leite UAT (ultra alta temperatura) e bebidas lácteas, possibilitando um maior tempo de atividade proteolítica sobre as caseínas do leite (BÜRGER et al., 2015; VIDAL et al., 2005).

Nota-se também um pequeno aumento de ácido siálico livre no controle negativo (cujo leite foi esterilizado). Isso pode ser decorrente da presença de metaloproteínases endógenas contidas no leite, como a plasmina, que colaboram na deterioração das caseínas, principalmente em produtos de elevada validade comercial (CORASSIM et al., 2013). Além disso, enzimas proteolíticas provenientes dos leucócitos podem atuar igualmente sobre algumas frações proteicas do leite, dentre elas as caseínas, contribuindo assim para o aumento da hidrólise (VERDI; BARBANO, 1988), já que leites com elevada Contagem de Células Somáticas, o que não foi mensurado no presente estudo, tendem a ter maiores concentrações de plasmina (LE ROUX; LAURENT; MOUSSAOUI, 2003).

## **CONCLUSÃO**

A deterioração proteica da kappa-caseína ocasionada pelas metaloproteínases secretadas pelo *Bacillus cereus* elevaram os teores de ácido siálico livre durante o tempo de prateleira do leite pasteurizado. Tempos prolongados de armazenando de produtos lácteos colaboram para o aumento na deterioração proteica, ocasionando defeitos tecnológicos.

**AGRADECIMENTOS**

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo 2015 /20874-0).



## REFERÊNCIAS

BROWN, J. V.; WILES, R.; PRENTICE, G. A. The effect of a modified Tyndallization process upon the sporeforming bacteria of milk and cream. **Journal of the Society of Dairy Technology**. v. 32. p. 109-113, 1979.

BÜRGER, K. P.; ROSSI, G. A. M.; VIDAL, A. M. C.; GRISOLIO, A. P. R.; GONÇALVES, A. C. S.  $\kappa$ -casein proteolysis during the shelf-life of UHT milk and milk beverage. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 22, n. 3-4, p. 220-223, jul./dez. 2015.

CLOSS, E.; SOUZA, C. F. V. Avaliação do teor de caseínomacropeptídeo (CMP) nos leites cru e UAT ao longo do tempo de armazenamento. **Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos**, v. 2, n. 2, p. 111-119, 2011.

CORASSIN, C. H.; ROSIM, R. E.; KOBASHIGAWA, E.; FERNANDES, A. M.; DE OLIVEIRA, C. A. Relationship between plasmin activity and casein fractions during storage of UHT milk. **Brazilian Journal of Food Technology**. v. 16, n. 1, p. 29-33, 2013.

DUSMALISILE, P.; WITTHUHN, R. C.; BRITZ, T. J. Impact of different pasteurization temperatures on the survival of microbial contaminants isolated from pasteurized milk. **International Journal of Dairy Technology**, v. 58, n. 2, p. 74-82, 2005.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO. **FAO/Statistical databases** - FAOSTAT. [2017]. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/>> Acesso em: 21/04/2018.

FRANKLIN, J. G. Some bacteriological problems in the market milk industry in the UK. **International Journal of Dairy Technology**. v. 22(2), p. 100-112, 1969.

FUKUDA, S. P.; RÖIG, S. M.; PRATA, L. F. Correlation between acidic ninhydrin and HPLC methods to evaluate fraudulent addition of whey in milk. **Le Lait**, v. 84, n. 5, p. 501–512, 2004.

GARCÍA-ROMERO, A.; MAYORGA-LLERENA, E. Correlación de glicomacropéptido de lacto suero dulce con proteasas de bacterias psicrótrofas

e identificação de leite adulterado. **Anais X Congresso de ciência y tecnología Espe**, 2015.

HARAGUCHI, F. K.; ABREU, W. C.; DE PAULA, H. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. **Revista de Nutrição**. Campinas, v. 19, p. 479-488, 2006.

IZIDORO, T. B., PEREIRA, J. G., SOARES, V. M., SPINA, T. L. B.; PINTO, J. P. D. A. N. Proteolytic activity of psychrotrophic bacteria in milk stored at different temperatures. **Revista Ceres**. v. 60, p. 452-457, 2013.

LE ROUX, Y.; LAURENT, F.; MOUSSAOUI, F. Polymorphonuclear proteolytic activity and milk composition change. **Veterinary Research**, v. 34, n. 5, p. 629-645, 2003.

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

KABLE, M. E.; SRISENGFA, Y.; LAIRD, M.; ZARAGOZA, J.; MCLEOD, J.; HEIDENREICH, J.; MARCO, M.L. The core and seasonal microbiota of raw bovine milk in tanker trucks and the impact of transfer to a milk processing facility. **mBio**. v. 7, n. 4, p. 1-13, 2016.

KIM, H.; KIM, H.; BANG, J.; KIM, Y.; BEUCHAT, L. R.; RYU, J. H. Reduction of *Bacillus cereus* spores in sikhye, a traditional Korean rice beverage, by modified tyndallization process with and without carbon dioxide injection. **Letters in Applied Microbiology**, v. 55, p. 218-223, 2012.

MARCHAND, S., DUQUENNE, B., HEYNDRICKX, M., COUDIJZER, K., & DE BLOCK, J. Destabilization and off-flavors generated by *Pseudomonas* proteases during or after UHT-processing of milk. **International Journal of Food Contamination**, v. 4, p. 1-7, 2017.

MARTELLO, L. Avaliação da implantação das boas práticas agropecuárias para a qualidade e segurança do leite de uma cooperativa do Estado do Rio Grande do Sul. **Tese de Mestrado**, 2017.

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.

OANCEA, S. Identification of glycomacropeptide as indicator of milk and dairy drinks adulteration with whey by immunochromatographic assay. **Romanian Biotechnology Letters**, v. 14, n. 1, p. 4146-4151, 2009.

PORCELLATO, D.; ASPHOLM, M.; SKEIE, S. B.; MELLEGÅRD, H. Application of a novel amplicon-based sequencing approach reveals the diversity of the *Bacillus cereus* group in stored raw and pasteurized milk. **Food Microbiology**, p. 1-8. 2018

PRATA, L. F.; PRATA, C. B. Determinação de GMP e CMP\* no leite por métodos espectrofotométrico (ANSM) e cromatográfico (HPLC) – parâmetros metodológicos (\*Glicomacropeptídeo e Caseinomacropeptídeo). **Archives of Veterinary Science**. v. 17, n. 2, p. 29-39, 2012.

PRATA, L. F. Determinação de (Glicomacropeptídeo) no leite por meio da quantificação do ácido siálico – Esclarecimentos para adoção e implantação do método. **Revista Indústria de Laticínios**, v. 16, n. 81, p. 75-80, 2009.

STADHOUDERS, J. The enumeration of spores and vegetative cells of *Bacillus cereus*. **Bulletin of the International Dairy Federation.**, n. 275, p. 15-18, 1992.

VERDI, R. J.; BARBANO, D. M. Preliminary investigation of the properties of somatic cell proteases. **Journal of Dairy Science**, v. 71, n. 2, p. 534-538, 1988.

VIDAL, A. M. C.; SALOTTI, B. M.; ROSSI JUNIOR, O. D.; PENNA, A. L. B. Evolução do índice proteolítico e do comportamento reológico durante a tempo de prateleira de leite UAT/UHT. **Food Science and Technology**. v. 25, p. 698-704, 2005.

VILELA, D.; RESENDE, J. C.; LEITE, J. B.; ALVES, E. A evolução do leite no Brasil em cinco décadas. **Revista de Política Agrícola**. v. 26, n. 1. 2017.

WALSTRA. P. On the Stability of Casein Micelles. **Journal of Dairy Science**, v. 73, n. 8, p. 1975-1979, 1990.

YAO, K.; UBUKA, T. Determination of sialic acids by acidic ninhydrin reaction. **Acta Medica**. v. 41, p. 137-241, 1987.

**DOCUMENTO SUPLEMENTAR 1**

<b>N</b>	<b>ID</b>	<b>Cepa</b>	<b>Cód. NCBI</b>	<b>Detalhes</b>	<b>N</b>	<b>ID</b>	<b>Cód. NCBI</b>	<b>Cepa</b>	<b>Detalhes</b>
1	637	<b>Gabriel_01</b>	Em registro	Teteira	36	677	Em registro	<b>Gabriel_54</b>	Utensílio - fazenda de leite
2	638	<b>Gabriel_02</b>	Em registro	Tubulação de ordenha - fazenda	37	678	Em registro	<b>Gabriel_55</b>	Teteira
3	640	<b>Gabriel_07</b>	Em registro	Tubulação de ordenha - fazenda	38	679	Em registro	<b>Gabriel_56</b>	Teteira
4	641	<b>Gabriel_08</b>	Em registro	Tubulação de ordenha - fazenda	39	680	Em registro	<b>Gabriel_57</b>	Utensílio - fazenda de leite
5	642	<b>Gabriel_09</b>	Em registro	Tubulação de ordenha - fazenda	40	681	Em registro	<b>Gabriel_58</b>	Tanque de refrigeração
6	643	<b>Gabriel_10</b>	Em registro	Tubulação – laticínio	41	682	Em registro	<b>Gabriel_59</b>	Teteira
7	644	<b>Gabriel_11</b>	Em registro	Equipamentos – laticínio	42	683	Em registro	<b>Gabriel_60</b>	Latão de leite - fazenda Utensílio - caminhão transp.
8	645	<b>Gabriel_12</b>	Em registro	Equipamentos – laticínio	43	684	Em registro	<b>Gabriel_61</b>	Leite cru
9	646	<b>Gabriel_13</b>	Em registro	Caminhão transportador	44	685	Em registro	<b>Gabriel_62</b>	Tanque de refrigeração
10	647	<b>Gabriel_15</b>	Em registro	Caminhão transportador	45	686	Em registro	<b>Gabriel_63</b>	Tanque de refrigeração
11	649	<b>Gabriel_17</b>	Em registro	Queijo Minas	46	687	Em registro	<b>Gabriel_64</b>	Utensílio - fazenda de leite
12	650	<b>Gabriel_18</b>	Em registro	Bebida láctea UAT	47	688	Em registro	<b>Gabriel_65</b>	Leite cru
13	652	<b>Gabriel_23</b>	Em registro	Utensílios – laticínios	48	689	Em registro	<b>Gabriel_66</b>	Utensílio - fazenda de leite
14	653	<b>Gabriel_24</b>	Em registro	Utensílios – laticínios	49	690	Em registro	<b>Gabriel_67</b>	Utensílio - fazenda de leite
15	655	<b>Gabriel_27</b>	Em registro	Utensílio - fazenda de leite	50	691	Em registro	<b>Gabriel_68</b>	Leite cru
16	656	<b>Gabriel_28</b>	Em registro	Creme preparado com queijo	51	692	Em registro	<b>Gabriel_69</b>	Leite cru
17	658	<b>Gabriel_30</b>	Em registro	Cappuccino	52	693	Em registro	<b>Gabriel_71</b>	Leite cru
18	659	<b>Gabriel_31</b>	Em registro	Requeijão	53	694	Em registro	<b>Gabriel_72</b>	Leite cru
19	660	<b>Gabriel_32</b>	Em registro	Requeijão	54	696	Em registro	<b>Gabriel_74</b>	Leite cru
20	661	<b>Gabriel_33</b>	Em registro	Requeijão	55	697	Em registro	<b>Gabriel_75</b>	Leite cru
21	662	<b>Gabriel_34</b>	Em registro	Requeijão	56	698	Em registro	<b>Gabriel_76</b>	Utensílio - fazenda de leite
22	663	<b>Gabriel_35</b>	Em registro	Requeijão	57	699	Em registro	<b>Gabriel_78</b>	Utensílio - fazenda de leite
23	664	<b>Gabriel_36</b>	Em registro	Requeijão	58	700	Em registro	<b>Gabriel_79</b>	Utensílio - fazenda de leite
24	665	<b>Gabriel_37</b>	Em registro	Requeijão	59	701	Em registro	<b>Gabriel_81</b>	Requeijão
25	666	<b>Gabriel_38</b>	Em registro	Requeijão	60	702	Em registro	<b>Gabriel_82</b>	Requeijão
26	667	<b>Gabriel_39</b>	Em registro	Equipamentos – laticínio	61	703	Em registro	<b>Gabriel_83</b>	Requeijão
27	668	<b>Gabriel_41</b>	Em registro	Latão de leite – fazenda	62	704	Em registro	<b>Gabriel_84</b>	Requeijão
28	669	<b>Gabriel_43</b>	Em registro	Tanque de refrigeração	63	705	Em registro	<b>Gabriel_85</b>	Requeijão
29	670	<b>Gabriel_45</b>	Em registro	Utensílio - fazenda de leite	64	706	Em registro	<b>Gabriel_86</b>	Requeijão
30	671	<b>Gabriel_46</b>	Em registro	Balde de ordenha - fazenda	65	707	Em registro	<b>Gabriel_87</b>	Requeijão
31	672	<b>Gabriel_47</b>	Em registro	Latão de leite – fazenda	66	708	Em registro	<b>Gabriel_88</b>	Requeijão
32	673	<b>Gabriel_48</b>	Em registro	Latão de leite – fazenda	67	709	Em registro	<b>Gabriel_89</b>	Requeijão
33	674	<b>Gabriel_49</b>	Em registro	Leite cru	68	710	Em registro	<b>Gabriel_90</b>	Requeijão
34	675	<b>Gabriel_50</b>	Em registro	Latão de leite – fazenda	69	711	Em registro	<b>Gabriel_95</b>	Leite cru
35	676	<b>Gabriel_53</b>	Em registro	Teteira					

**DOCUMENTO SUPLEMENTAR 2****(Parte 1)**

<b>N</b>	<b>ID</b>	<b>Cepa</b>	<b>Código NCBI (acesso)</b>	<b>Espécie</b>	<b>Detalhes</b>
1	225	BT 10792	CM000753.1	<i>B. thuringiensis</i>	Ferida necrótica humana - Yugoslavia
2	226	BT 9727	AE017355.1	<i>B. thuringiensis</i>	Lepidoptera - Germany
3	227	<b>BT407</b>	<b>CP003889.1</b>	<i>B. thuringiensis</i>	-
4	228	BT IS5056	CP004123.1	<i>B. thuringiensis</i>	-
5	229	BT BMB171	CP001903.1	<i>B. thuringiensis</i>	-
6	230	BT HD-771	CP003752.1	<i>B. thuringiensis</i>	-
7	231	BT HD-789	CP003763.1	<i>B. thuringiensis</i>	-
8	232	BT MC28	CP003687.1	<i>B. thuringiensis</i>	Floresta na China
9	233	BT CT-43	CP001907.1	<i>B. thuringiensis</i>	China
10	234	BT YBT-020	CP002508.1	<i>B. thuringiensis</i>	serovar finitimus
11	235	BT HD73	CP004069.1	<i>B. thuringiensis</i>	Lepidoptera - France
12	236	BT Al Hakam	CP009651.1	<i>B. thuringiensis</i>	Iraq
13	238	BT DAR 81934	CM001804.1	<i>B. thuringiensis</i>	Australia
14	239	BT IBL 200	CM000758.1	<i>B. thuringiensis</i>	Humano
15	240	BT IBL 4222	CM000759.1	<i>B. thuringiensis</i>	Gato
16	241	BT BGSC 4AW1	CM000754.1	<i>B. thuringiensis</i>	Espanha
17	242	BT BGSC 4BD1	CM000756.1	<i>B. thuringiensis</i>	China
18	243	BT T03a001	CM000751.1	<i>B. thuringiensis</i>	Lepidoptera
19	244	BT BGSC 4AJ1	CM000752.1	<i>B. thuringiensis</i>	Mexico
20	245	BT t13001	CM000750.1	<i>B. thuringiensis</i>	Lepidoptera
21	246	BT BGSC 4BA1	CM000755.1	<i>B. thuringiensis</i>	Solo - India
22	247	BT BGSC 4CC1	CM000757.1	<i>B. thuringiensis</i>	Grain Field - Pakistan
23	248	BT T04001	CM000749.1	<i>B. thuringiensis</i>	Canada
24	249	BT T01001	CM000748.1	<i>B. thuringiensis</i>	Lepdopitera
25	250	BT BGSC 4Y1	CM000746.1	<i>B. thuringiensis</i>	Solo - Japão
26	252	BT ATCC 35646	AAJM00000000.1	<i>B. thuringiensis</i>	-
27	253	BA Ames	AE016879.1	<i>B. anthracis</i>	cepa avirulenta
28	254	BA A0248	CP001598.1	<i>B. anthracis</i>	Humano - Ohio
29	255	BA Steme	AE017225.1	<i>B. anthracis</i>	Desenvolvimento vacina
30	256	BA CDC 684	CP001215.1	<i>B. anthracis</i>	-
31	257	BA Ames Ancestor	AE017334.2	<i>B. anthracis</i>	Padrão ouro
32	258	BA A2012	AAAC01000001.1	<i>B. anthracis</i>	Doença respiratória - Florida
33	259	BA H9401	CP002091.1	<i>B. anthracis</i>	Antrax cutâneo - Humano - Korea
34	260	BA 3154	ANFF01000002.1	<i>B. anthracis</i>	Solo - Bulgaria
35	261	BA 3166	NZ_ANFG00000000.1	<i>B. anthracis</i>	Solo - Bulgaria
36	262	BA A0174	NZ_ABLT00000000.1	<i>B. anthracis</i>	Canada
37	263	BA A0193	NZ_ABKF00000000.1	<i>B. anthracis</i>	Bovino - Dakota do Sul/USA
38	264	BA A0389	NZ_ABLB00000000.1	<i>B. anthracis</i>	Indonésia
39	265	BA A0442	NZ_ABKG00000000.1	<i>B. anthracis</i>	Antelope - África do Sul
40	266	BA A0465	NZ_ABLH00000000.1	<i>B. anthracis</i>	Bovino - França
41	267	BA A0488	NZ_ABJC00000000.1	<i>B. anthracis</i>	Bovino - UK - alta virulência
42	268	BA A1055	NZ_AAEO01000033.3	<i>B. anthracis</i>	EUA
43	269	BA Australia 94	NZ_AAES01000044.3	<i>B. anthracis</i>	Australia
44	270	BA BF-1	AMDT01000001.1	<i>B. anthracis</i>	Carcassa bovino - Alemanha
45	271	BA CNEVA-9066	NZ_AAEN01000027.3	<i>B. anthracis</i>	França
46	272	BA Carbosap	NZ_ANAO00000000.1	<i>B. anthracis</i>	Vacina animal - Itália
47	273	BA Gmb1	NZ_CAVE00000000.1	<i>B. anthracis</i>	serovar Ames
48	274	BA Heroin Ba4599	NZ_AGQP00000000.1	<i>B. anthracis</i>	Heroína - Escócia
49	275	BA KrugerB	NZ_AAEQ00000000.1	<i>B. anthracis</i>	Animal - Kruger Nat. Park/África do Sul
50	276	BA Sen2Col2	NZ_CAVC00000000.1	<i>B. anthracis</i>	serovar Ames

**DOCUMENTO SUPLEMENTAR 2****(Parte 2)**

<b>N</b>	<b>ID</b>	<b>Cepa</b>	<b>Código NCBI (acesso)</b>	<b>Espécie</b>	<b>Detalhes</b>
51	277	BA Sen3	NZ_CAVD00000000.1	<i>B. anthracis</i>	serovar Ames
52	278	BA Tsiankovskii-I	NZ_ABDN00000000.2	<i>B. anthracis</i>	Russia Usuário de heroína - Alemanha
53	279	BA UR-1	ALNY00000000.1	<i>B. anthracis</i>	UK-Espanha-Zimbabwe
54	280	BA Vollum	CP007666.1	<i>B. anthracis</i>	França e América do Norte
55	281	BA WesternNA USA6153	NZ_AAER00000000.1	<i>B. anthracis</i>	-
56	282	BC ATCC14579	AE016877.1	<i>B. cereus</i>	Caso de pneumonia fatal
57	283	BC B4264	CP001176.1	<i>B. cereus</i>	Fratura aberta - Nova Iorque
58	284	BC F65185	CM000736.1	<i>B. cereus</i>	Pneumonia severa - USA
59	285	BC 03BB102	CP009318.1	<i>B. cereus</i>	Vômito humano - UK
60	286	BC AH187	CP001177.1	<i>B. cereus</i>	Região Periodontal - Noruega
61	287	BC AH820	CP001283.1	<i>B. cereus</i>	Queijo - Canada
62	288	BC ATCC10987	AE017194.1	<i>B. cereus</i>	Carcassa de zembra - Namibia
63	289	BC E33L	CP000001.1	<i>B. cereus</i>	Ferida humana
64	290	BC F0837/76	CP003187.1	<i>B. cereus</i>	-
65	291	BC FRI-35	CP003747.1	<i>B. cereus</i>	Amostra clínica- Nebraska
66	292	BC G9842	CP001186.1	<i>B. cereus</i>	Síndrome emética
67	293	BC NC7401	AP007209.1	<i>B. cereus</i>	Apatogênica
68	294	BC Q1	CP000227.1	<i>B. cereus</i>	Caso fatal - chipamzé
69	295	BC CI	CP001746.1	<i>B. cereus</i>	Ferida
70	296	BC 172560W	CM000717.1	<i>B. cereus</i>	Endocardite - UK
71	297	BC 95-8201	CM000727.1	<i>B. cereus</i>	Lamp - Iceland
72	298	BC AH1271	CM000739.1	<i>B. cereus</i>	Fluído Amniótico - Islândia
73	299	BC AH1272	CM000740.1	<i>B. cereus</i>	Sangue humano - Islândia
74	300	BC AH1273	CM000741.1	<i>B. cereus</i>	Lácteo
75	301	BC AH603	CM000737.1	<i>B. cereus</i>	Solo - Noruega
76	302	BC AH621	CM000719.1	<i>B. cereus</i>	ATCC
77	303	BC AH676	CM000738.1	<i>B. cereus</i>	-
78	304	BC ATCC10876	CM000715.1	<i>B. cereus</i>	Sensível a fago gama
79	305	BC 4342	CM000721.1	<i>B. cereus</i>	-
80	306	BC BDRD-Bcer4	CM000726.1	<i>B. cereus</i>	-
81	307	BC BDRD-ST196	CM000725.1	<i>B. cereus</i>	-
82	308	BC BDRD-ST24	CM000723.1	<i>B. cereus</i>	-
83	309	BC BDRD-ST26	CM000724.1	<i>B. cereus</i>	-
84	310	BC BGSC 6E1	CM000716.1	<i>B. cereus</i>	-
85	311	BC F	CM001787.1	<i>B. cereus</i>	Amostra antiga de permafrost
86	312	BC MM3	CM000718.1	<i>B. cereus</i>	Alimento
87	313	BC R309803	CM000720.1	<i>B. cereus</i>	Septicemia - UK
88	314	BC Rock1-15	CM000729.1	<i>B. cereus</i>	Solo - USA
89	315	BC Rock1-3	CM000728.1	<i>B. cereus</i>	Solo - USA
90	316	BC Rock3-28	CM000730.1	<i>B. cereus</i>	Solo - USA
91	317	BC Rock3-29	CM000731.1	<i>B. cereus</i>	Solo - USA
92	318	BC Rock3-42	CM000732.1	<i>B. cereus</i>	Solo - USA
93	319	BC Rock3-44	CM000733.1	<i>B. cereus</i>	Solo - USA
94	320	BC Rock4-18	CM000735.1	<i>B. cereus</i>	Solo - USA
95	321	BC Rock4-2	CM000734.1	<i>B. cereus</i>	Solo - USA
96	322	BC m1293	CM000714.1	<i>B. cereus</i>	Cream cheese
97	323	BC mm1550	NZ_CM000722.1	<i>B. cereus</i>	Frango cru - Brasil
98	324	BC 03BB108	CP009641.1	<i>B. cereus</i>	Pneumonia - Humano
99	325	BC AH1134	NZ_ABDA00000000.2	<i>B. cereus</i>	Endoftalmite - USA
100	326	BC AND1407	NZ_AHCM00000000.1	<i>B. cereus</i>	-

**DOCUMENTO SUPLEMENTAR 2****(Parte 3)**

<b>N</b>	<b>ID</b>	<b>Cepa</b>	<b>Código NCBI (acesso)</b>	<b>Espécie</b>	<b>Detalhes</b>
101	327	BC B5-2	NZ_AHFW00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
102	328	BC BAG10-1	NZ_AHCN00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
103	329	BC BAG10-2	NZ_AHCO00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
104	330	BC BAG1X1-1	NZ_AHCQ00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
105	331	BC BAG1X1-2	NZ_AHCR00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
106	332	BC BAG1X1-3	NZ_AHCS00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
107	333	BC BAG1X2-1	NZ_AHCT00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
108	334	BC BAG1X2-2	NZ_AHCU00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
109	335	BC BAG1X2-3	NZ_AHCV00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
110	336	BC BAG20-1	NZ_AHCW00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
111	337	BC BAG20-3	NZ_AHCY00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
112	338	BC BAG2X1-1	NZ_AHCZ00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
113	339	BC BAG2X1-2	NZ_AHDA00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
114	340	BC BAG2X1-3	NZ_AHDB00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
115	341	BC BAG30-1	NZ_AHJV00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
116	342	BC BAG30-2	NZ_AHDC00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
117	343	BC BAG3X2-1	NZ_AHDD00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
118	344	BC BAG3X2-2	NZ_AHDE00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
119	345	BC BAG40-1	NZ_AHDF00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
120	346	BC BAG4X12-1	NZ_AHDG00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
121	347	BC BAG4X2-1	NZ_AHDG00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
122	348	BC BAG50-1	NZ_AHDI00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
123	349	BC BAG5X1-1	NZ_AHDJ00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
124	350	BC BAG5X12-1	NZ_AHDK00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
125	351	BC BAG5X2-1	NZ_AHDL00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
126	352	BC BAG60-1	NZ_AHDM00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
127	353	BC BAG60-2	NZ_AHDN00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
128	354	BC BAG6X1-1	NZ_AHDO00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
129	355	BC BAG6X1-2	NZ_AHDP00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
130	356	BC BMG1.7	NZ_AHDQ00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
131	357	BC BtB2-4	NZ_AHDR00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
132	358	BC CER057	NZ_AHDS00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
133	359	BC CER074	NZ_AHDT00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
134	360	BC G9241	NZ_CP009590.1	<i>B. cereus</i>	Anthrax-like
135	362	BC H3081.97	NZ_ABDL00000000.2	<i>B. cereus</i>	cepa emetica
136	363	BC HD73	NZ_AHDU00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
137	364	BC HuA2-1	NZ_AHDV00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
138	365	BC HuA2-3	NZ_AHDW00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
139	366	BC HuA2-4	NZ_AHDW00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
140	367	BC HuA2-9	NZ_AHDY00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
141	368	BC HuA3-9	NZ_AHDZ00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
142	369	BC HuA4-10	NZ_AHEA00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
143	370	BC HuB1-1	NZ_AHEB00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
144	371	BC HuB13-1	NZ_AHEC00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
145	372	BC HuB2-9	NZ_AHED00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
146	373	BC HuB4-10	NZ_AHEE00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
147	374	BC HuB4-4	NZ_AHEF00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
148	375	BC HuB5-5	NZ_AHEG00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
149	376	BC IS075	NZ_AHCH00000000.2	<i>B. cereus</i>	-
150	377	BC IS195	NZ_AHEH00000000.1	<i>B. cereus</i>	-



**DOCUMENTO SUPLEMENTAR 2****(Parte 4)**

<b>N</b>	<b>ID</b>	<b>Cepa</b>	<b>Código NCBI (acesso)</b>	<b>Espécie</b>	<b>Detalhes</b>
151	378	BC IS845/00	NZ_AHEI00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
152	379	BC ISP2954	NZ_AHEJ00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
153	380	BC ISP3191	NZ_AHEK00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
154	381	BC K-5975c	NZ_AHEL00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
155	382	BC LCT-BC244	NZ_AJGQ00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
156	383	BC MC118	NZ_AHEM00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
157	384	BC MC67	NZ_AHEN00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
158	385	BC MSX-A1	NZ_AHEO00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
159	386	BC MSX-A12	NZ_AHEP00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
160	387	BC MSX-D12	NZ_AHEQ00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
161	388	BC NVH0597-99	NZ_ABDK00000000.2	<i>B. cereus</i>	mix de temperos - Noruega
162	389	BC SJ1	NZ_ADFM00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
163	390	BC TIAC219	NZ_AHCJ00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
164	391	BC VD014	NZ_AHER00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
165	392	BC VD021	NZ_AHES00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
166	393	BC VD022	NZ_AHCK00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
167	395	BC VD048	NZ_AHEU00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
168	396	BC VD078	NZ_AHEV00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
169	397	BC VD102	NZ_AHEW00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
170	398	BC VD107	NZ_AHEX00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
171	399	BC VD115	NZ_AHEY00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
172	400	BC VD118	NZ_AHEZ00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
173	401	BC VD131	NZ_AHFA00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
174	402	BC VD133	NZ_AHFB00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
175	404	BC VD140	NZ_AHFD00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
176	405	BC VD142	NZ_AHCL00000000.2	<i>B. cereus</i>	-
177	406	BC VD146	NZ_AHFE00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
178	407	BC VD148	NZ_AHFF00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
179	408	BC VD154	NZ_AHFG00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
180	410	BC VD166	NZ_AHFI00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
181	411	BC VD169	NZ_AHFJ00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
182	412	BC VD184	NZ_AHFK00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
183	413	BC VD196	NZ_AHFL00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
184	414	BC VD200	NZ_AHFM00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
185	415	BC VD214	NZ_AHFN00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
186	416	BC VDM006	NZ_AHFT00000000.1	<i>B. cereus</i>	antrax-like
187	417	BC VDM019	NZ_AHFO00000000.	<i>B. cereus</i>	-
188	419	BC VDM022	NZ_AHFP00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
189	420	BCVDM034	NZ_AHFQ00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
190	421	BC VDM053	NZ_AHFR00000000.1	<i>B. cereus</i>	-
191	422	BC VDM062	NZ_AHFS00000000.1	<i>B. cereus</i>	-