

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO RIO GRANDE DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS  
MESTRADO PROFISSIONAL EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**MARION RUIS**

**QUANTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE  
ESPORULADOS ISOLADOS DA MATRIZ LEITE EM PÓ PRODUZIDO E  
COMERCIALIZADO NO RIO GRANDE DO SUL**

ENCANTADO  
2022



**uergs**

Universidade Estadual do Rio Grande do Sul

**PPGCTA**

Programa de Pós-Graduação em  
Ciência e Tecnologia de Alimentos



**MARION RUIS**

**QUANTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE  
ESPORULADOS ISOLADOS DA MATRIZ LEITE EM PÓ PRODUZIDO E  
COMERCIALIZADO NO RIO GRANDE DO SUL**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, Unidade Encantado, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Karla Joseane Perez

Coorientador: Dr. Hans Fröder

**ENCANTADO  
2022**

Catálogo de publicação na fonte (CIP)

R934q Ruis, Marion

Quantificação e caracterização da diversidade genética de esporulados isolados da matriz leite em pó produzido e comercializado no Rio Grande do Sul/Marion Ruis. – Encantado: Uergs, 2022.

84 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Unidade em Encantado, 2022.

Orientadora: Profa. Dra. Karla Joseane Perez

Coorientador: Dr. Hans Fröder

1. Esporulados. 2. Leite em pó. 3. Sequenciamento. 4. Dissertação. I. Perez, Karla Joseane. II. Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Unidade em Encantado, 2022. III. Título.

**MARION RUIS**

**QUANTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE  
ESPORULADOS ISOLADOS DA MATRIZ LEITE EM PÓ PRODUZIDO E  
COMERCIALIZADO NO RIO GRANDE DO SUL**

Dissertação apresentada como requisito parcial  
para obtenção do título de Mestre em Ciência e  
Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Karla Joseane Perez

Coorientador: Dr. Hans Fröder

Aprovada em: 25/08/2022.

**BANCA EXAMINADORA:**

---

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Karla Joseane Perez  
Universidade Estadual do Rio Grande do Sul

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosiele Lappe Padilha  
Universidade Estadual do Rio Grande do Sul

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Stela Maris Meister Meira  
Instituto Federal do Rio Grande do Sul

---

Prof. Dr. Alfonso David Rodríguez Lázaro  
Universidade de Burgos

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS pela minha vida, por guiar meus passos durante minha jornada e por me dar forças para não desistir diante dos obstáculos.

Aos meus pais, Beatriz e Héctor (*in memoriam*), e aos meus irmãos Mariel, Douglas e Ana Laura por serem minha base e meu porto seguro, em especial a minha mãe, que é a força e o ponto de equilíbrio de toda a família.

Ao meu companheiro de vida, Rodrigo, pelo apoio, pelo incentivo, pela paciência e pelo amor.

À professora e orientadora Karla Joseane Perez pela orientação, pela oportunidade e pelos ensinamentos.

Ao meu amigo e coorientador Hans Fröder pelos ensinamentos e por estar presente desde a ideia e a elaboração até a execução desse projeto, não medindo esforços para que tudo desse certo.

A todos os professores do curso de mestrado pelos ensinamentos e pela contribuição para a minha formação, em especial ao prof. Voltaire por todo o apoio prestado.

À UNIVATES/Unianálises pela oportunidade de trabalho e de crescimento profissional.

À Tainá Drebes pela oportunidade e pela confiança em meu trabalho, pelas trocas diárias de conhecimento, pelas boas risadas e pela amizade.

À UERGS pela oportunidade de estudo.

A todos os envolvidos, minha eterna gratidão!

## RESUMO

O leite é um alimento rico em nutrientes e, devido às suas características intrínsecas, pode apresentar uma microbiota diversa oriunda do sistema produtivo. Para aumentar a vida de prateleira, bem como facilitar o transporte e o armazenamento desse alimento, surgiu o leite em pó. O tratamento térmico utilizado no processamento dessa matriz elimina as formas vegetativas de micro-organismos, mas nem sempre é capaz de eliminar os esporos existentes. Além do consumo direto, o leite em pó é utilizado como ingrediente para outros produtos lácteos e sua qualidade microbiológica está relacionada à estabilidade do leite *in natura* e às condições de processamento. O objetivo desse trabalho é quantificar, identificar e caracterizar a diversidade de esporos em amostras de leite em pó produzidas no Rio Grande do Sul, visando conhecer a diversidade genética dos isolados. Diferentes marcas comerciais de leite em pó foram analisadas em um laboratório prestador de serviços localizado no Estado do Rio Grande do Sul. Dessas marcas, foram escolhidas 14 amostras aleatoriamente, as quais foram submetidas à análise de esporos. Para a quantificação dos esporos, após a pesagem e a diluição inicial da amostra, foi aplicado o tratamento térmico específico para cada análise, onde o princípio é elevar a temperatura, com posterior resfriamento em banho de gelo. Após o tratamento térmico, realizou-se diluições decimais subsequentes e adicionou-se ágar específico com posterior incubação. Houve contagens de esporos em todas as amostras analisadas, sendo os termófilos tanto aeróbios totais quanto anaeróbios com maior nível de contaminação, chegando a 4,56 log<sub>10</sub> UFC/g e 3,95 log<sub>10</sub> UFC/g, respectivamente. Para a identificação das bactérias formadoras de esporos, um total de 47 isolados foram selecionados para sequenciamento do gene 16S rRNA, sendo identificados como: *Weizmannia coagulans* (21%), *Anoxybacillus flavithermus* (5,3%), *Clostridium butyricum* (5,3%), *Bacillus amyloliquefaciens* (2,6%), *Geobacillus stearothermophilus* (2,6%), *Clostridium pabulibutyricum* (2,6%), *Clostridium sporosphaeroides* (2,6%), *Bacillus licheniformis* (2,6%), *Bacillus* sp. (34%), *Geobacillus* sp. (15,8%) e *Clostridium* sp. (5,3%). Foram identificadas espécies tanto deteriorantes (*B.licheniformis*, *W. coagulans*, *B. amyloliquefaciens*, *G. stearothermophilus*, *A. flavithermus*, *C. butyricum*, *C. pabulibutyricum* e *C. sporosphaeroides*) quanto com capacidade de produção de toxinas (*B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* e *C. butyricum*), podendo causar danos à saúde de consumidores e perdas econômicas às empresas. Dessa forma, os resultados indicam a necessidade de estabelecer medidas de controle para melhorar as condições de higiene e de processamento do leite em pó, garantindo a qualidade do produto e a segurança do consumidor.

**Palavras-chave:** 16S rRNA. Esporulados. Leite em pó. Sequenciamento.

## ABSTRACT

Milk is a food rich in nutrients, and given its intrinsic characteristics, it can present a diverse microbiota from the production system. Milk powder has been developed to increase the shelf life and facilitate the transport and storage of this foodstuff. The heat treatment used in the processing of this matrix eliminates the vegetative forms of microorganisms, although it is not always able to eliminate the existing spores. In addition to direct consumption, powdered milk is used as an ingredient for other dairy products, and its microbiological quality is related to the stability of milk *in natura* and processing conditions. Thus, this work aimed to quantify, identify, and characterize the diversity of spores in samples of powdered milk produced in Rio Grande do Sul State to know the genetic diversity of the isolates. Different commercial brands of powdered milk were analyzed in a service provider laboratory in Rio Grande do Sul. From these brands, 14 samples were randomly chosen and submitted to spore analysis. For spore quantification, after weighing and initial dilution of the sample, the specific heat treatment for each analysis was applied, where the principle was to raise the temperature with subsequent cooling in an ice bath. After the heat treatment, subsequent decimal dilutions and specific agar were added with subsequent incubation. There were spore counts in all the samples analyzed, with total aerobic and anaerobic thermophiles having the highest level of contamination, reaching 4.56 log<sub>10</sub> CFU/g and 3.95 log<sub>10</sub> CFU/g, respectively. For identifying spore-forming bacteria, 47 isolates were selected for 16S rRNA gene sequencing; they were identified as *Weizmannia coagulans* (21%), *Anoxybacillus flavithermus* (5.3%), *Clostridium butyricum* (5.3%), *Bacillus amyloliquefaciens* (2.6%), *Geobacillus stearothermophilus* (2.6%), *Clostridium pabulibutyricum* (2.6%), *Clostridium sporosphaeroides* (2.6%), *Bacillus licheniformis* (2.6%), *Bacillus* sp. (34%), *Geobacillus* sp. (15.8%), and *Clostridium* sp. (5.3%). Moreover, species considered deteriorating (*B. licheniformis*, *W. coagulans*, *B. amyloliquefaciens*, *G. stearothermophilus*, *A. flavithermus*, *C. butyricum*, *C. pabulibutyricum*, and *C. sporosphaeroides*) and capable of producing toxins (*B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, and *C. butyricum*) were identified, which can cause damage to the health of consumers and economic losses to companies. Therefore, the results indicate the need to establish control measures to improve the hygiene and processing conditions of powdered milk, thereby ensuring product quality and consumer safety.

**Keywords:** 16S rRNA. Spores. Milk powder. Sequencing.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>9</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>11</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	11
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	11
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>12</b>
3.1 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA PRIMA E QUALIDADE MICROBIOLÓGICA	12
<b>3.1.1 Leite cru</b> .....	<b>12</b>
<b>3.1.2 Deterioração do leite e derivados associados aos micro-organismos</b> .....	<b>13</b>
3.2 LEITE EM PÓ.....	14
<b>3.2.1 Caracterização do leite em pó</b> .....	<b>14</b>
<b>3.2.2 Etapas do processamento</b> .....	<b>15</b>
<b>3.2.3 Legislação: critérios microbiológicos e tolerância</b> .....	<b>18</b>
3.3 MICRO-ORGANISMOS ESPORULADOS ASSOCIADOS A CONTAMINAÇÃO EM ALIMENTOS .....	19
3.4 CARACTERÍSTICAS DOS PRINCIPAIS MICRO-ORGANISMOS FORMADORES DE ESPOROS ISOLADOS DE PRODUTOS LÁCTEOS DESIDRATADOS.....	20
<b>3.4.1 Gênero <i>Bacillus</i></b> .....	<b>20</b>
<b>3.4.2 Gênero <i>Geobacillus</i></b> .....	<b>21</b>
<b>3.4.3 Gênero <i>Clostridium</i></b> .....	<b>22</b>
<b>3.4.4 Gênero <i>Anoxybacillus</i></b> .....	<b>22</b>
<b>3.4.5 Gênero <i>Paenibacillus</i></b> .....	<b>23</b>
3.5 FORMAÇÃO DO ESPORO BACTERIANO.....	23
<b>3.5.1 Estrutura do Esporo</b> .....	<b>24</b>
<b>3.5.2 Germinação</b> .....	<b>25</b>
3.6 MÉTODOS MOLECULARES .....	26
<b>3.6.1 Sequenciamento do DNA</b> .....	<b>27</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>29</b>
4.1 COLETA DE AMOSTRAS .....	29
4.2 ANÁLISE DE ESPOROS BACTERIANOS EM LEITE EM PÓ .....	29
<b>4.2.1 Contagem e isolamento de esporos de bactérias aeróbias mesófilas</b> .....	<b>29</b>
<b>4.2.2 Contagem e isolamento de esporos de bactérias aeróbias termófilas</b> .....	<b>30</b>
<b>4.2.3 Contagem e isolamento de esporos de bactérias anaeróbias mesófilas</b> .....	<b>30</b>

<b>4.2.4 Contagem e isolamento de esporos de bactérias anaeróbias termófilas</b> .....	<b>31</b>
4.3 MATERIAL DE REFERÊNCIA .....	31
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	32
4.5 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS.....	32
<b>4.5.1 Extração e purificação de DNA</b> .....	<b>32</b>
<b>4.5.2 Amplificação do gene 16S rRNA pela reação em cadeia da polimerase (PCR)</b> .....	<b>33</b>
<b>4.5.3 Sequenciamento e análise das sequências</b> .....	<b>34</b>
4.6 CONSTRUÇÃO DA ÁRVORE FILOGENÉTICA .....	34
<b>4.6.1 Alinhamento e <i>outgroup</i></b> .....	<b>34</b>
<b>4.6.2 Análises filogenéticas</b> .....	<b>35</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>36</b>
5.1 QUANTIFICAÇÃO DOS ESPORULADOS.....	36
5.2 MATERIAL DE REFERÊNCIA .....	43
5.3 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS.....	44
5.4 CARACTERIZAÇÃO FILOGENÉTICA .....	49
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>51</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>52</b>
<b>APÊNDICE A - RESULTADOS DAS CONTAGENS DE ESPOROS REALIZADAS NAS AMOSTRAS DE LEITE EM PÓ</b> .....	<b>60</b>
<b>APÊNDICE B - DESCRIÇÃO DOS ESPORULADOS ISOLADOS EM LEITE EM PÓ</b> .....	<b>61</b>
<b>APÊNDICE C - RESULTADOS DAS CONTAGENS DE ESPOROS REALIZADAS NAS AMOSTRAS DE LEITE EM PÓ REFERÊNCIA</b> .....	<b>64</b>
<b>APÊNDICE D – ARTIGO A SER PUBLICADO</b> .....	<b>65</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Atualmente, a busca pela segurança e pela qualidade dos alimentos produzidos pelas indústrias é acompanhada e cada vez mais exigida pelo consumidor. Para garantir essa qualidade, todas as etapas do processo produtivo devem ser controladas, o que vai desde o recebimento e o processamento da matéria-prima até a comercialização do produto.

O leite é um alimento rico em nutrientes e desde a Antiguidade é utilizado pelo homem como complemento à sua alimentação. Devido às suas características, o leite *in natura* pode apresentar uma microbiota diversa, que inclui bactérias e esporos oriundos do sistema produtivo. Para aumentar a vida de prateleira, bem como para facilitar o transporte e o armazenamento desse alimento, surgiu o leite em pó.

O leite em pó é utilizado, além do consumo direto, como ingrediente para outros produtos lácteos e sua qualidade microbiológica está relacionada à estabilidade do leite *in natura* e às condições de processamento. O tratamento térmico utilizado no processamento dessa matriz elimina as formas vegetativas de micro-organismos, porém nem sempre é capaz de acabar com os esporos existentes.

Os esporos são estruturas de resistência e de sobrevivência que algumas bactérias têm a capacidade de formar quando se encontram em condições ambientais desfavoráveis. Durante o tratamento térmico na indústria, o esporo pode ser ativado iniciando a germinação. Na ausência da microbiota competitiva, em condições adequadas e após germinarem, formam células vegetativas que se multiplicam, podendo causar deterioração em matérias-primas e produtos processados. Essa deterioração acarreta perdas econômicas significativas e danos à reputação da indústria ou, dependendo da espécie presente, há a produção de toxinas capazes de causar doenças veiculadas por alimentos (DVAs), sendo um risco potencial para a saúde dos consumidores.

As enzimas proteolíticas e lipolíticas produzidas pelos esporulados deteriorantes são termoestáveis, sendo responsáveis pela modificação dos principais constituintes dos alimentos que contaminam. Mesmo em concentrações baixas, as proteases e as lipases causam defeitos no leite em pó, onde as enzimas são preservadas, podendo ser reativadas após a sua reconstituição.

Em estudos já realizados, os principais micro-organismos esporulados isolados de produtos lácteos desidratados, como o leite em pó, foram *Anoxybacillus flavithermus*, *Geobacillus* sp., *Paenibacillus* sp., assim como os do gênero *Bacillus* e *Clostridium*, nos quais

há espécies patogênicas e produtoras de toxinas (KARAMAN; ALVAREZ, 2014). No entanto, são necessários mais estudos para maior caracterização e conhecimento das espécies presentes.

Dentre os micro-organismos esporulados deteriorantes, pode-se citar o *Geobacillus stearothermophilus* e o *Bacillus sporothermodurans*, que, embora não apresentem risco à saúde do consumidor, são indicadores de condições insatisfatórias de higiene e de boas práticas de fabricação.

Um dos principais problemas na indústria de alimentos é a contaminação da matéria-prima, de modo que a seleção de ingredientes é considerada crítica, principalmente o leite em pó, já que é um dos ingredientes usados para produtos de panificação, confeitaria, sobremesas lácteas, chocolates e fórmulas infantis. O desenvolvimento de esporos deve ser controlado, já que populações elevadas aumentam a probabilidade de sobrevivência e a posterior germinação no alimento processado. Além disso, algumas espécies do gênero *Bacillus* podem formar biofilmes, que aderem às superfícies de equipamentos e utensílios, resistindo aos procedimentos de limpeza e de sanificação ao longo da linha de processamento.

Frente aos poucos estudos realizados sobre os micro-organismos esporulados, e sabendo que eles sobrevivem às etapas de processamento, o presente estudo tem o objetivo de quantificar e identificar quais são as espécies de esporulados predominantes no leite em pó, um dos produtos mais utilizados como ingrediente na produção de alimentos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do presente trabalho é identificar e caracterizar a diversidade de esporos mesófilos e termófilos, aeróbios e anaeróbios em amostras de leite em pó produzidas no Rio Grande do Sul, visando conhecer a diversidade genética dos isolados.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar os micro-organismos esporulados mesófilos e termófilos (aeróbios/anaeróbios) avaliando a contaminação por esporos no leite em pó produzido no Rio Grande do Sul;
- Avaliar a metodologia *American Public Health Association* (APHA, 2015), utilizada com modificações para a realização de um método por contagem em placas para os esporos anaeróbios mesófilos e termófilos;
- Determinar a diversidade e identificar os isolados em gênero e nível de espécie através do sequenciamento do gene 16S rRNA;
- Realizar análise filogenética com as sequências obtidas.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA PRIMA E QUALIDADE MICROBIOLÓGICA

##### 3.1.1 Leite cru

Conforme o Decreto n. 9.013 de 29 de março de 2017, o leite é o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta e em condições de higiene de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas (BRASIL, 2017).

O leite é composto de proteínas, carboidratos, gorduras, sais minerais, vitaminas e água. Em razão de seus componentes, combinados com a elevada atividade de água e o pH quase neutro, é considerado um alimento de alto valor nutritivo e um excelente meio para o desenvolvimento de micro-organismos, incluindo os benéficos, os deteriorantes e os patogênicos (VIDAL; NETTO, 2018).

Assim que é retirado do úbere de animais sadios, o leite cru apresenta baixa contaminação por micro-organismos e, em geral, a contagem total é de aproximadamente  $<10^3$  log<sub>10</sub> UFC/mL. Porém, após a ordenha, ele está sujeito à contaminação por micro-organismos oriundos de diversas fontes, como superfície externa dos tetos, manipuladores, equipamentos utilizados na ordenha e meio ambiente. Se as condições de higiene forem negligenciadas durante a ordenha, a carga microbiana pode chegar a  $10^6$  log<sub>10</sub> UFC/mL (MOATSOU; MOSCHOPOULOU, 2014). Conforme a Instrução Normativa n. 76 de 26 de novembro de 2018, o leite cru deve apresentar médias geométricas trimestrais de contagem padrão em placas de, no máximo,  $3,0 \times 10^5$  log<sub>10</sub> UFC/mL.

Os micro-organismos de maior importância do ponto de vista tecnológico são os que contaminam o leite durante e após a ordenha. Santana *et al.* (2004) estudaram quatro propriedades no estado do Paraná, onde analisaram diversas etapas do processo de produção do leite e verificaram que os principais pontos de contaminação foram a água residual de latões, os tanques de expansão e os tetos higienizados inadequadamente.

Em outro estudo conduzido por Guerreiro *et al.* (2005), eles pesquisaram propriedades leiteiras para observar as condições higiênicas durante e após a ordenha. Na pesquisa, constataram que havia falhas nos procedimentos de higiene e de limpeza em todas as propriedades, além de muitos animais estarem com mastite subclínica. Christiansson *et al.* (1999) verificaram a contaminação do leite cru por esporos de *Bacillus cereus* e constataram

que a principal fonte desses esporos foi o solo, por contato indireto do úbere e das glândulas mamárias. O nível dessa contaminação variou entre 2,48 a 5,15 log<sub>10</sub> UFC/mL.

Assim, a deterioração por micro-organismos é o principal fator limitante para a extensão da vida de prateleira do leite pasteurizado, dependendo fundamentalmente da qualidade do leite cru, ou seja, da contagem inicial dos micro-organismos, do tipo de bactérias presentes e das condições de armazenamento às quais o leite cru é submetido (SCHMIDT *et al.*, 2012).

As principais bactérias presentes no leite cru refrigerado relacionadas à deterioração são *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Cronobacter*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium* e *Klebsiella*. Entre os micro-organismos termodúricos, capazes de sobreviver ao tratamento térmico, estão *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Enterococcus* e *Lactobacillus*, destacando-se os formadores de esporos *Bacillus*, *Geobacillus* e *Clostridium*, que podem causar danos aos derivados lácteos (CRUZ *et al.*, 2019).

Os esporulados mais encontrados no leite cru são *Paenibacillus lactis*, *B. cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus sporothermodurans* e *Geobacillus stearothermophilus*. Algumas linhagens são produtoras de enterotoxinas e podem apresentar riscos à saúde do consumidor (MOATSOU; MOSCHOPOULOU, 2014).

Assim, a qualidade microbiológica do leite é dependente de um manejo adequado desde a produção até a indústria processadora, uma vez que gera impactos diretos tanto na produção de derivados lácteos quanto na segurança do alimento.

### **3.1.2 Deterioração do leite e derivados associados aos micro-organismos**

A deterioração do leite cru refrigerado ou tratado termicamente e de seus derivados pode ocorrer devido às proteases e às lipases produzidas pelas bactérias. Essas enzimas apresentam elevada resistência térmica, mantendo seu potencial de degradação mesmo após tratamentos térmicos, como a pasteurização ou o tratamento *Ultra-High Temperature* (UTH) (JUNIOR, 2015).

Mesmo que não provoquem danos à saúde do consumidor, essas enzimas causam um impacto econômico negativo na industrialização do leite e de seus derivados. As proteases atuam diretamente na caseína, causando sabor amargo, e as lipases, por sua vez, produzem cadeias médias e curtas de ácidos graxos que conferem ao leite sabor e aroma rançoso, influenciando diretamente na qualidade do produto e diminuindo a estabilidade e a vida útil (BELOTI *et al.*, 2015).

Apesar de o leite ser submetido a tratamentos térmicos, os esporos bacterianos altamente resistentes ao calor também poderão estar presentes no produto, em decorrência das condições precárias de obtenção da matéria-prima. As bactérias esporuladas mais resistentes ao calor pertencem aos gêneros *Bacillus* e *Clostridium* (VIDAL-MARTINS *et al.*, 2005).

O gênero *Bacillus*, que possui representantes produtores de proteases, age sobre a k-caseína, resultando na desestabilização das micelas da caseína e na coagulação do leite. Essa categoria de enzimas está relacionada a problemas tecnológicos, como a sedimentação, a gelificação do leite UHT e o desenvolvimento de sabor amargo no leite e em outros produtos lácteos (RECIO *et al.*, 2000).

Em um estudo realizado por Mareze (2017), foi identificada a espécie *B. licheniformis* em amostras de leite cru refrigerado, onde 63% das cepas isoladas apresentaram atividade proteolítica e lipolítica. Ribeiro (2015) constatou que as contagens de esporos aeróbios nas amostras de leite foram relativamente baixas, mas que 30% das espécies isoladas apresentaram atividade proteolítica e/ou lipolítica. A microbiota proteolítica foi composta predominantemente por *B. licheniformis*, seguido por *Bacillus pumilus* e por *Bacillus* sp., e a lipolítica por *B. licheniformis*, seguido por *B. pumilus*, *Bacillus circulans*, *Bacillus* sp. e *Paenibacillus* sp.

A qualidade sensorial do leite em pó pode ser afetada pela presença de lipases na matéria-prima. O processo de secagem do leite não diminui a atividade lipolítica no leite em pó e a enzima permanece ativa durante a estocagem do produto, causando a rancificação do leite em pó não desnatado (BELOTI *et al.*, 2015).

## 3.2 LEITE EM PÓ

### 3.2.1 Caracterização do leite em pó

De acordo com a Instrução Normativa n. 53 de 1º de outubro de 2018, o leite em pó é o produto que se obtém pela desidratação do leite de vaca integral, desnatado ou parcialmente desnatado e apto para a alimentação humana, mediante processos tecnologicamente adequados. Deve conter somente proteínas, açúcares, gorduras e outras substâncias minerais do leite nas mesmas proporções relativas, salvo pelas modificações originadas do processo tecnológico (BRASIL, 2018).

Levando em consideração o teor de gordura, comercialmente é designado como leite em pó integral aquele que possui o teor mínimo de 26%; como leite em pó parcialmente

desnatado um teor maior que 1,5% e menor que 26%; como leite em pó desnatado um teor máximo de 1,5%; e como leite em pó semidesnatado um teor mínimo de 14% e máximo de 16%. De acordo com a umectabilidade e a dispersabilidade, o leite em pó pode ser classificado como instantâneo ou não (BRASIL, 2018).

O leite em pó começou a ser produzido com o objetivo de aumentar a vida de prateleira, diminuir os custos com transporte e estocagem devido à redução no volume e oferecer um produto com maior concentração de sólidos do leite, servindo como ingrediente às indústrias produtoras de sorvetes, de produtos de confeitaria e de fórmulas infantis, dentre outros alimentos (CRUZ *et al.*, 2019).

### 3.2.2 Etapas do processamento

As etapas envolvidas no processamento do leite em pó são o recebimento da matéria-prima, o resfriamento, a padronização, a pasteurização, a concentração, a secagem e a embalagem (Figura 1). Para ser recebido no estabelecimento, o leite cru deve estar refrigerado a 7,0°C, admitindo-se excepcionalmente o recebimento até 9,0°C. Posteriormente ao recebimento, o produto deve ser armazenado sob refrigeração de 4,0°C e ser submetido a testes de controle de qualidade para verificar se o produto atende aos parâmetros físico-químicos, microbiológicos e de características sensoriais (BRASIL, 2018).

Após os testes de controle de qualidade, o leite é filtrado para remover as impurezas maiores e estocado em tanques de resfriamento até o momento da clarificação, quando é aquecido até 45°C para facilitar a retirada de partículas de impurezas menores, as quais são removidas através de métodos mecânicos de força centrífuga. Na etapa de padronização, o principal objetivo é a obtenção de um produto com composição química definida, permitindo uma homogeneidade. O leite é aquecido até atingir uma temperatura entre 45 e 55°C e centrifugado para separar a gordura, que posteriormente é restabelecida na quantidade desejada (FERNANDES, 2009).

A pasteurização tem por objetivo eliminar as células vegetativas de micro-organismos patogênicos e inativar as enzimas. Costuma-se utilizar três condições de aquecimento com variações no binômio tempo-temperatura, como o tratamento térmico baixo (74°C por 30 segundos), médio (de 80 a 100°C de 1 a 2 minutos) e alto (de 120 a 135°C por 1 a 2 minutos). Em seguida, o leite é concentrado até atingir 50% dos sólidos totais (CRUZ *et al.*, 2019).

Na etapa de concentração, ocorre a eliminação parcial da água, retirando até 85% da umidade do leite e auxiliando na redução dos custos na etapa posterior de secagem, quando os

15% restantes serão eliminados. A evaporação pode ser obtida através de evaporadores sob condições de vácuo, evitando a desnaturação das proteínas, ou evaporadores com trocadores de calor posicionados verticalmente, que separam por centrifugação o líquido e o vapor formado. Outra técnica utilizada é a filtração através de membrana, na qual as partículas são separadas de acordo com o tamanho (CARIC *et al.*, 2009).

A etapa de secagem tem por finalidade obter um produto estável, de baixa umidade e com mínimas alterações sensoriais. A secagem consiste na eliminação da água mediante a aplicação de calor e pode ser obtida por dois diferentes processos: através de rolos ou de *spray-dryer* (FERNANDES, 2009).

O processamento com rolos é constituído por um ou mais cilindros rotativos, aquecidos internamente pelo uso de vapor com temperaturas entre 130 e 150°C. Durante a rotação, o leite fluido seca na superfície do rolo, a camada seca é removida e moída para dar ao produto a forma de um pó fino, que segue para embalagem (FERNANDES, 2009).

O processo de *spray-dryer* converte materiais líquidos em produtos em pó. O leite é pulverizado dentro de uma câmara submetida à corrente de ar quente controlada. A temperatura do ar na câmara varia de 180 a 220°C e, ao entrar em contato com as gotículas de leite, causa a remoção instantânea da água e a formação de pó (ANANDHARAMAKRISHNAN *et al.*, 2015). O ar sai da câmara entre 70 e 95°C, evitando que a alta temperatura do ar de secagem afete o produto (Figura 2). Atualmente, é a técnica mais utilizada por ser eficiente e econômica, comportar equipamento simples e permitir uma produção em grande escala, além de causar menos alterações no produto (CRUZ *et al.*, 2019).

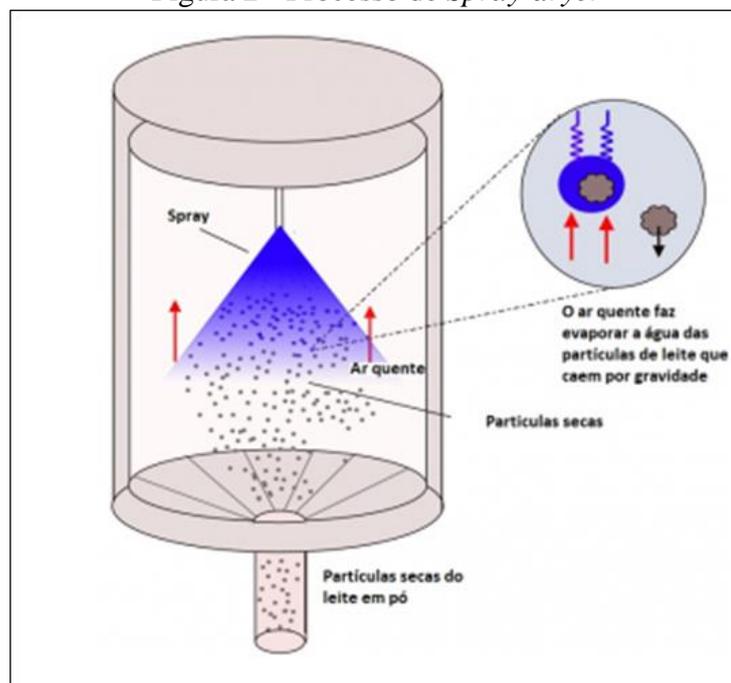
Para a finalização do processamento e da produção de leite em pó, é realizado o envase do alimento em embalagens estéreis. O recipiente é criado como uma proteção física, impedindo a entrada de oxigênio e o contato com a luz e mantendo a integridade do alimento. O leite em pó desnatado possui validade de aproximadamente três anos, enquanto o leite integral possui no máximo seis meses de validade, pelo fato de a gordura do pó oxidar durante o armazenamento, com a conseqüente deterioração e alteração do sabor (TETRA PAK, 2016).

Figura 1 - Etapas do processamento do leite em pó



Fonte: Autora (2022).

Figura 2 - Processo de *Spray-dryer*



Fonte: Site [alfacom.net](https://alfacom.net), disponível em: <https://alfacom.net/2019/08/30/automacao-da-fabricacao-de-leite-em-po-com-clp-haiwell/>.

### 3.2.3 Legislação: critérios microbiológicos e tolerância

No Brasil há duas legislações vigentes para o leite em pó: a Instrução Normativa n. 53 de 1º de outubro de 2018, do Ministério da Agricultura (MAPA), e a Instrução Normativa n. 161 de 1º de julho de 2022, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). As análises e os limites de tolerância abrangentes nas legislações se encontram na Tabela 1.

Tabela 1 – Padrões microbiológicos para o leite em pó conforme as IN n. 53 e n. 161\*

	Parâmetros			
<i>Salmonella</i> /25g	n = 10	c = 0	m = ausência	M = -
<i>Enterobacteriaceae</i> /g	n = 5	c = 0	m = 10	M = -
Estafilococos coagulase positiva/g	n = 5	c = 1	m = 10	M = 10 <sup>2</sup>
Aeróbios mesófilos/g	n = 5	c = 2	m = 3 x 10 <sup>4</sup>	M = 1 x 10 <sup>5</sup>
Enterotoxinas estafilocócicas (ng/g)	n = 5	c = 0	m = ausência	M = -

Legenda: n é o número de amostras a serem coletadas de um mesmo lote, m é o limite com qualidade intermediária aceitável, M é o limite máximo aceitável, valores acima de M são inaceitáveis, c é o número aceitável de amostras com contagens entre os limites m e M. \*Somente a IN n. 161 prevê um parâmetro para a análise de Enterotoxinas estafilocócicas.

Fonte: IN n. 53 (BRASIL, 2018) e IN n. 161 (BRASIL, 2022).

No Brasil, não há legislação que contemple a quantificação de esporos bacterianos no leite em pó, devendo a empresa estabelecer o seu limite. Nos Estados Unidos da América (EUA), o Conselho de Exportação de Laticínios (Council) implementa limites de esporos aeróbios termófilos em  $<5 \times 10^2 \log_{10}$  UFC/g e em  $<10^3 \log_{10}$  UFC/g para esporos aeróbios mesófilos em leite em pó destinado a clientes internacionais. Na Irlanda, a *Food Safety Authority of Ireland* (FSAI) afirma que a contagem de esporos aeróbios em produtos lácteos em pó deve ser idealmente  $<10^4 \log_{10}$  UFC/g. A China estabeleceu o limite de  $10^3 \log_{10}$  UFC/g para esporos aeróbios em fórmulas lácteas em pó para lactentes (WATTERSON *et al.*, 2014; YUAN *et al.*, 2012).

### 3.3 MICRO-ORGANISMOS ESPORULADOS ASSOCIADOS A CONTAMINAÇÃO EM ALIMENTOS

Algumas bactérias Gram-positivas têm a capacidade de formar estruturas resistentes, chamadas esporos ou endósporos. Os esporos suportam condições de estresse ambiental que seriam letais para as células vegetativas, como exposição a altas temperaturas, congelamento, desidratação, irradiação, conservantes e desinfetantes. Uma vez formados, eles permanecem em estado de dormência, sem atividade metabólica e sem se multiplicar. Em condições favoráveis, eles germinam e dão origem a células vegetativas que voltam a se reproduzir (BUEHNER *et al.*, 2014).

Os micro-organismos formadores de esporos podem ser agrupados em mesófilos e termófilos, conforme a sua temperatura ótima de crescimento, e classificados como aeróbios ou anaeróbios, de acordo com a fonte de energia que utilizam. A deterioração causada pelos esporulados pode ser do tipo *Flat Sour* termofílico, *Flat Sour* acidúrico, mesófilos anaeróbios, sulfito deteriorantes e termófilos anaeróbios (SEGNER, 1979 *apud* REYES, 2008).

Na deterioração *Flat Sour* termofílico, ocorre o crescimento de linhagens de *G. stearothermophilus*, capazes de crescer a 65°C, mas não a 37°C, produzindo ácido e ocasionando a diminuição do pH do produto sem a produção de gás. Na deterioração *Flat Sour* acidúrico, tem-se o crescimento de linhagens de *Bacillus coagulans*, capazes de crescer entre 37 e 55°C, que são responsáveis pela diminuição do pH do produto. Nos mesófilos anaeróbios, há o crescimento de linhagens de *Clostridium*, que produzem gás durante o processo e podem estufar as embalagens, em geral baixando o pH do produto. A deterioração sulfito deteriorantes é causada por linhagens de *Desulfotomaculum nigrificans*, cujos micro-organismos produzem um odor característico de podridão. Na deterioração dos termófilos anaeróbios, vê-se o crescimento de linhagens do gênero *Clostridium*, produzindo ácido e grandes quantidades de gás (SEGNER, 1979 *apud* REYES, 2008).

As bactérias esporogênicas mais associadas aos alimentos são dos gêneros *Clostridium*, *Desulfotomaculum*, *Bacillus*, *Sporolactobacillus*, *Thermoanaerobacter*, *Thermoanaerobacterium*, *Moorella*, *Aeribacillus*, *Alicyclobacillus*, *Aneurinibacillus*, *Anoxybacillus* e *Geobacillus* (SILVA *et al.*, 2017). Nos principais micro-organismos esporulados isolados de produtos lácteos desidratados, como o leite em pó, incluem-se *Anoxybacillus flavithermus*, *Geobacillus* sp., *Paenibacillus* sp., *Bacillus* sp. e *Clostridium* sp. (KARAMAN; ALVAREZ, 2014).

Li *et al.* (2019) analisaram 22 amostras de leite em pó na Irlanda com o objetivo de verificar a ocorrência dos esporulados e de identificar as espécies. Utilizando o método de sequenciamento pelo 16S rRNA, dos 269 isolados, 68% foram identificados como *B. licheniformis*, 16% eram outras espécies de *Bacillus*, incluindo *B. cereus* grupo e *B. coagulans*, e, em menor quantidade, foram identificados outros gêneros, incluindo *Clostridium*, *Geobacillus* e *Anoxybacillus*.

Devido à alta resistência, os esporos bacterianos constituem um problema para a indústria de alimentos, sendo fundamental a sua identificação para possibilitar o controle.

### 3.4 CARACTERÍSTICAS DOS PRINCIPAIS MICRO-ORGANISMOS FORMADORES DE ESPOROS ISOLADOS DE PRODUTOS LÁCTEOS DESIDRATADOS

#### 3.4.1 Gênero *Bacillus*

A primeira classificação do gênero *Bacillus* foi feita por Smith, Gordon e Clark em 1946 (HARWOOD, 1989). A partir da década de 1990, com a tecnologia de sequenciamento e de análise do gene 16S rRNA, o gênero passou por grandes mudanças, de modo que novos gêneros e famílias foram criados (ROBINSON, 2014). Entre os diversos novos gêneros, é possível citar *Alicyclobacillus*, *Brevibacillus*, *Geobacillus* e *Paenibacillus*, entre outros (REYES, 2008).

As bactérias do gênero *Bacillus* são bastonetes móveis, em sua maioria produtores de catalase, Gram-positivos, aeróbios ou anaeróbios facultativos. A maior parte das espécies são mesófilas, com temperatura ótima de crescimento de 25 e 37°C, mas existem espécies termófilas e psicrotólicas que podem crescer em temperaturas tão altas quanto 75°C ou tão baixo quanto 3°C, respectivamente. As características da colônia variam entre as espécies, sendo as mais comuns as colônias grandes, planas, com bordas irregulares e espalhadas. São isolados do solo, da vegetação, da água e do ar, a maioria não é patogênica, mas contaminam alimentos, sendo algumas espécies produtoras de toxinas que podem causar enfermidades no ser humano e em animais (JAY, 2005).

Algumas espécies suportam condições extremas de pH, variando de 2 a 10. Esse é o gênero mais comum entre os micro-organismos bacterianos que suportam as altas temperaturas utilizadas nos tratamentos de produtos lácteos, multiplicando-se e abrigando-se nos biofilmes e contaminando o produto à medida em que ele passa através das linhas de processamento e dos equipamentos de laticínios (MEHTA, 2018).

Algumas espécies do gênero são produtoras de enzimas, como proteases e lipases, influenciando a qualidade do leite e do produto lácteo por modificar o aroma, a textura, o sabor e o valor nutritivo (REYES, 2008). As lipases termorresistentes podem hidrolisar a gordura em produtos nos quais o leite em pó é adicionado como ingrediente (MEHTA, 2018).

Até 2019, o gênero *Bacillus* continha mais de 240 espécies, sendo considerado um desvio taxonômico pois seus indivíduos apresentam extensa polifilia, compartilhando poucas características em comum (BHANDARI *et al.*, 2013). Recentemente, o gênero foi revisado através dos estudos filogenéticos e genômicos comparativos de Gupta *et al.* (2020). Com base nos resultados desse estudo, foi proposto restringir a participação no gênero *Bacillus* somente às espécies que pertencem aos clados *Subtilis* e *Cereus*. Assim, 17 clados de espécies do gênero *Bacillus* devem ser reconhecidos como novos gêneros da família *Bacillaceae*, o que resulta na transferência de 77 espécies do gênero *Bacillus*. Atualmente, conforme o site *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature* (LPSN), do pesquisador J. P. Euzéby, há 103 espécies validamente publicadas e 414 espécies validamente publicadas, incluindo sinônimos (<https://lpsn.dsmz.de/genus/bacillus>).

### 3.4.2 Gênero *Geobacillus*

O gênero compreende um grupo de bactérias termofílicas com forma de bastonetes Gram-positivos aeróbios ou anaeróbios facultativos, que podem crescer em uma faixa de 45 a 75°C. Antes de 2001, eram agrupados junto de variantes termofílicas de *Bacillus* sp.; porém, tendo em vista uma combinação de análise da sequência do gene 16S rRNA e uma variedade de características físicas e bioquímicas, foi proposta a sua reclassificação para um novo gênero (HUSSEIN *et al.*, 2015).

Bactérias termofílicas formadoras de esporos, como *Geobacillus* sp., são contaminantes comuns de plantas de processamento de leite em pó. Seus esporos podem permanecer viáveis em todo o processo industrial, incluindo a pasteurização e as seções do evaporador. As bactérias desse gênero podem formar biofilmes nos equipamentos que, ao longo do tempo de processamento, possivelmente depositam cargas de esporos inaceitavelmente altas no produto (>10<sup>4</sup> log<sub>10</sub> UFC/g). Embora não seja perigoso para a saúde humana, isso leva a defeitos potenciais de qualidade e a perdas econômicas, exigindo que o processo seja interrompido e a planta totalmente limpa (PUTRI, 2017).

A espécie *G. stearothermophilus* está associada à deterioração do tipo “flat-sour”, na qual é produzido ácido através da fermentação dos carboidratos presentes no alimento,

causando acidificação sem a produção de gás e, devido a isso, não gera estufamento nas embalagens. Esse micro-organismo é capaz de hidrolisar a caseína, cuja deterioração geralmente é devida ao resfriamento lento ou à estocagem em altas temperaturas (REYES, 2008). Estima-se que mais de 50% do leite em pó produzido no mundo está contaminado com esse micro-organismo, representando mais de 10% dos isolados termófilos (DURAND *et al.*, 2015).

### 3.4.3 Gênero *Clostridium*

As bactérias do gênero *Clostridium* são bastonetes Gram-positivos e a maior parte das espécies são mesófilas, mas existem algumas termófilas, anaeróbios estritos, podendo ser móveis ou imóveis dependendo da espécie, com formação de esporos ovais ou esféricos que deformam a parede celular, e algumas espécies produzem toxinas, sendo um risco para a saúde pública. Seus esporos estão presentes no solo, na poeira, na água, em animais e na silagem, que constitui uma fonte potencial de contaminação do leite cru (GOMES, 2013).

As espécies patogênicas veiculadas por alimentos são *C. botulinum* e *C. perfringens*. As espécies importantes vistas como deteriorantes de alimentos são os clostrídios proteolíticos *C. botulinum*, *C. sporogenes*, *C. bifermentans*, *C. putrefaciens* e *C. histolyticum* e os clostrídios sacarolíticos *C. butyricum*, *C. pasteurianum*, *C. tyrobutyricum*, *C. beijerinckii* e *C. acetobutylicum* (SILVA *et al.*, 2017).

Os efeitos do desenvolvimento desses micro-organismos esporulados são a rancificação, a putrefação, a proteólise e a perda da consistência do produto. Os clostrídios que causam a fermentação butírica são denominados bactérias ácido butíricas, sendo *C. tirobutyricum*, *C. butyricum*, *C. perfringens*, *C. sporogenes* e *C. bifermentans* as principais espécies. O defeito mais relevante e economicamente importante causado por esse grupo é o estufamento tardio, além de sabores e odores desagradáveis no alimento (REYES, 2008).

### 3.4.4 Gênero *Anoxybacillus*

Bactérias desse gênero são bastonetes Gram-positivos com motilidade variável e anaeróbios facultativos. São moderadamente termofílicos, crescem entre 30 e 45°C, com temperatura ótima entre 50 e 62°C, e podem ser sacarolíticos ou proteolíticos. Dentre as espécies isoladas de alimentos, estão *A. flavithermus*, *A. contaminans* e *A. tepidamans* (CHOWDHURY *et. al*, 2012).

Assim como o *Geobacillus*, esse gênero também é capaz de formar biofilmes nas linhas de processamento industriais, fazendo com que a contaminação chegue até o produto (GOH *et al.*, 2013).

#### 3.4.5 Gênero *Paenibacillus*

As bactérias desse gênero são mesofílicas, aeróbias ou anaeróbias facultativas em forma de bastonetes Gram-positivos com motilidade positiva, que geralmente apresentam crescimento ótimo entre 28 e 40°C. São capazes de hidrolisar carboidratos complexos, cuja característica separou esse grupo de bactérias do gênero *Bacillus* (SILVA *et al.*, 2017). Algumas espécies produzem compostos antimicrobianos, como polimixina, octopitina, bacifelacina e antifúngicos (CHUNG *et al.*, 2000).

Esses micro-organismos têm sido isolados de várias fontes no ambiente, como solo, água, raízes de plantas, larvas de insetos e fábricas que produzem papéis para a indústria alimentícia. As espécies contaminantes de alimentos são *P. polymyxa*, *P. macerans* e *P. lactis* (RAASKA *et al.*, 2002).

O *Paenibacillus* está entre os gêneros bacterianos mais importantes na deterioração do leite e dos produtos lácteos devido à produção de enzimas deteriorantes, como proteases e lipases, que impactam na textura e no sabor desses alimentos. Muitas cepas também crescem bem em temperatura de refrigeração, sendo que o gênero representa mais de 95% das bactérias presentes no leite cru após 10 dias de refrigeração. Entre as espécies de *Paenibacillus* isoladas de laticínios, encontram-se *P. amylolyticus*, *P. lactis*, *P. lentimorbus*, *P. lucanolyticus*, *P. odorifer*, *P. peoriae* e *P. stellifer* (GRADY, *et al.*, 2016).

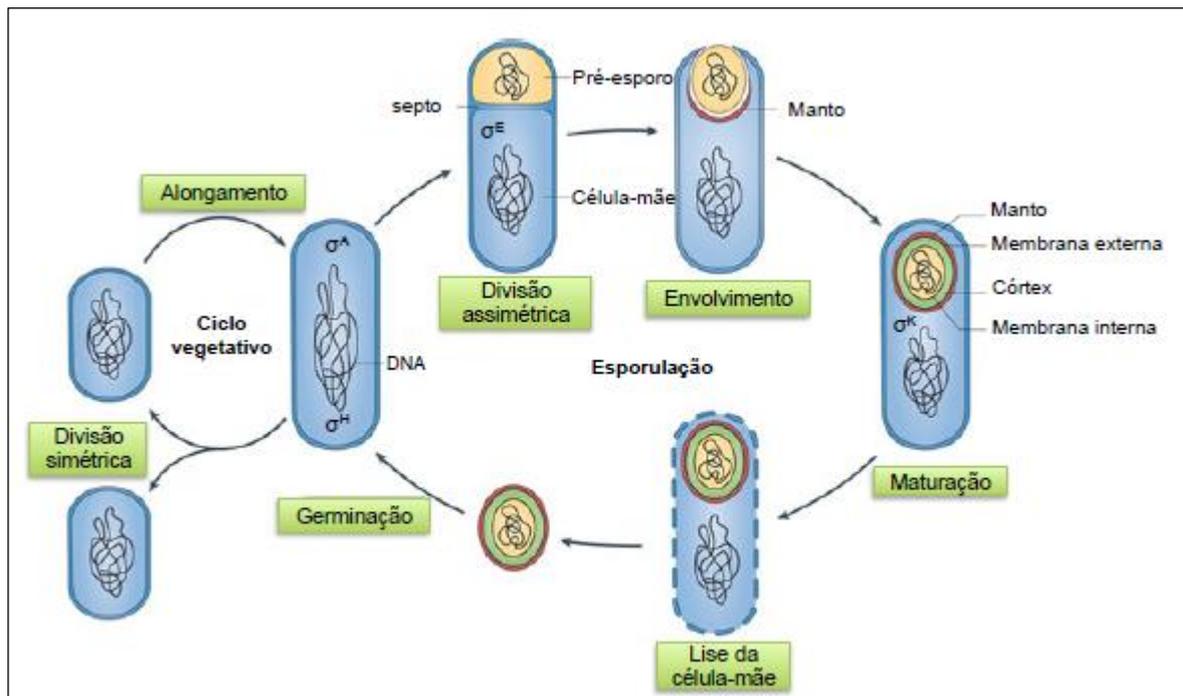
### 3.5 FORMAÇÃO DO ESPORO BACTERIANO

Os esporos são formados no final da fase de crescimento exponencial das células vegetativas e o seu desenvolvimento pode ser induzido por diversos fatores, como densidade populacional, falta de nutrientes, temperatura e pH adverso e disponibilidade de oxigênio, entre outros (MCKENNEY *et al.*, 2013).

Durante a formação do esporo, a célula sofre uma sequência de alterações morfológicas. Inicialmente, ocorre o alongamento da célula vegetativa e a divisão do cromossomo, criando um septo em um dos polos e dividindo-a em dois compartimentos desiguais. O compartimento maior é chamado de célula-mãe e o menor de pré-esporo; em seguida, há o processo de

envolvimento do pré-esporo pela célula mãe. Após essa etapa, ocorre a formação do córtex em torno do pré-esporo com duas camadas de peptidoglicano e a formação da capa, que é constituída por proteínas na superfície exterior do pré-esporo. Então ele desidrata, adquirindo maturação e resistência plena, e é liberado para o meio ambiente após a lise da célula-mãe, conforme representado na Figura 3 (PIGGOT; HILBERT, 2004).

Figura 3 – Etapas da esporulação



Fonte: MCKENNEY *et. al.*, 2013.

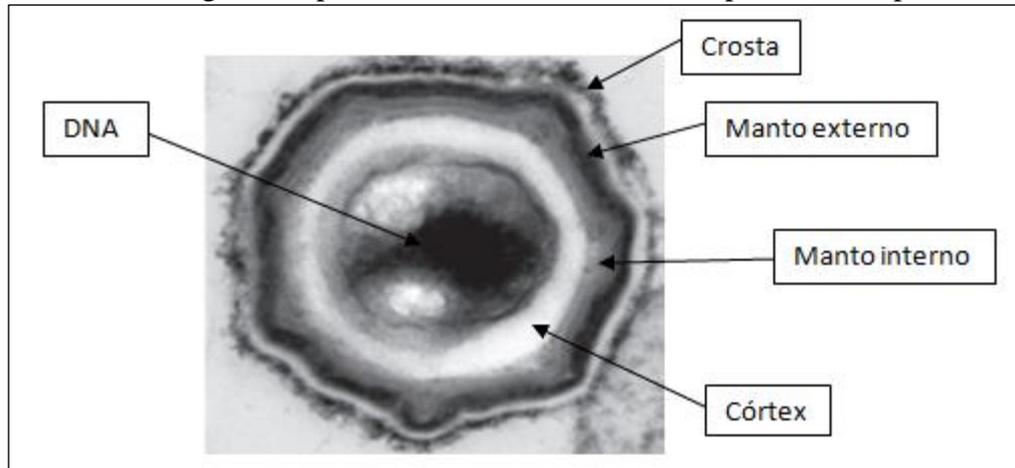
### 3.5.1 Estrutura do Esporo

A arquitetura do esporo é em parte responsável por sua resistência. A camada interior é o núcleo que contém o material genético e apresenta as proteínas ácido-solúveis (*small acid-soluble proteins* - SASPs) que se ligam ao DNA, tornando o material genético resistente a produtos químicos, à temperatura elevada e à radiação UV (MOIR, 2003).

Ao redor do núcleo, há uma membrana lipídica e uma camada de peptidoglicano formando o córtex, que é responsável pela baixa atividade de água do esporo. Nessa região, encontra-se um acúmulo de ácido dipicolínico (DPA) associado a cátions divalentes, principalmente íon cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), que corresponde a um percentual de 5 a 15% do peso seco do esporo. O acúmulo do DPA auxilia na resistência ao calor, à radiação e à desidratação (SETLOW, 2006).

Rodeando o córtex, há uma complexa estrutura proteica em camadas, chamada de manto (Figura 4), que serve como barreira contra fatores químicos e físicos e entrada de moléculas tóxicas, desempenhando um papel determinante na germinação do esporo (MCKENNEY *et al.*, 2013).

Figura 4 - Morfologia do esporo de *Bacillus subtilis* obtida por microscopia eletrônica



Fonte: adaptado de MCKENNEY *et al.*, 2013.

### 3.5.2 Germinação

A germinação é a transformação do esporo dormente em célula vegetativa, com todas as atividades metabólicas, como resposta às condições favoráveis do ambiente em que ele se encontra (ALLOUANE, *et al.*, 2008). A ativação do processo germinativo ocorre devido aos agentes germinantes nutritivos, que podem ser aminoácidos, açúcares e enzimas. A germinação também pode ser induzida por agentes como a dodecilamina, as enzimas e a alta pressão hidrostática (SETLOW, 2003).

O agente germinante atinge o córtex e interage com os receptores localizados na membrana interna e, em consequência dessa interação, ocorre a liberação de cátions ( $H^+$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ) do núcleo. Para que ocorra a reidratação do esporo, as enzimas têm a função de hidrolisar a membrana do córtex e, em seguida, quando o ácido dipicolínico associado ao cálcio é liberado, promover a hidratação do núcleo. A biossíntese recomeça e uma nova célula vegetativa emerge após a destruição da capa do esporo (MOIR, 2003). Segundo Setlow (2003), a liberação de ácido dipicolínico e de cálcio na germinação de um esporo pode estimular a germinação de outros localizados no mesmo ambiente.

### 3.6 MÉTODOS MOLECULARES

A detecção e a identificação de patógenos em alimentos por métodos convencionais envolve várias etapas, tendo por consequência a demora na liberação dos resultados, que pode levar dias ou semanas, sendo que, em alguns casos, é possível a identificação do gênero e, em poucos casos, a espécie (PALOMINO-CAMARGO; GONZÁLES-MUÑOZ, 2014).

A caracterização do micro-organismo ao nível de espécie é de grande importância para a indústria de alimentos, que necessita de monitoramento constante. Nos últimos anos, diversas técnicas moleculares surgiram para oferecer rapidez na detecção, juntamente com especificidade e sensibilidade (GORSKI; CSORDAS, 2009).

As técnicas moleculares para a identificação de micro-organismos se baseiam na detecção e na análise de sequências de genomas e dos produtos da expressão de genes, permitindo uma detalhada e precisa caracterização e diferenciação de micro-organismos. As técnicas de PCR, de PCR em tempo real, de espectrometria de massa e de sequenciamento de DNA são exemplos das ferramentas básicas da biologia molecular mais usualmente aplicadas na pesquisa (LAW *et al.*, 2015).

A análise da sequência do gene 16S rRNA é o método mais utilizado para a identificação bacteriana e a resolução de relações filogenéticas. Esse gene está presente em todos os procariontes, possuindo regiões conservadas e variáveis (Figura 5), sendo suficientemente informativo e tendo grandes bancos de dados disponíveis para a comparação de informações genéticas (CUNHA, 2016). Os gêneros que apresentam espécies intimamente relacionadas podem não ser discriminados pela análise do gene 16S rRNA devido à alta similaridade na região hipervariável do gene (MAIDEN *et al.*, 2013).

Figura 5 - Estrutura do gene 16S rRNA com aproximadamente 1500 pares de bases (pb)



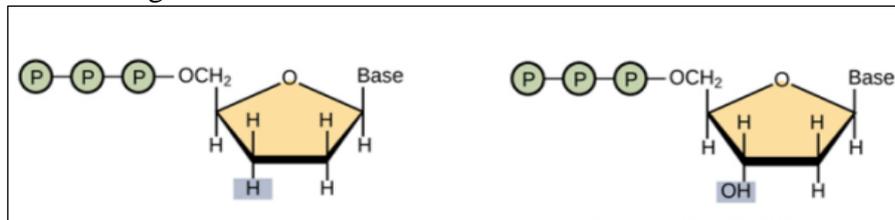
Fonte: CHRISTOFF, 2016

### 3.6.1 Sequenciamento do DNA

O sequenciamento de DNA é o processo de determinação da sequência de nucleotídeos em uma parte do DNA. O desenvolvimento dessa técnica se deu no início dos anos 1970, sendo o sequenciamento de Sanger *et al.* (1977) o método tradicional ainda utilizado.

O método Sanger automatizado envolve a síntese da fita de DNA de um gene de interesse. A metodologia utiliza desoxinucleotídeos naturais (dNTPs) e nucleotídeos modificados chamados de dideoxinucleotídeos (ddNTPs) (Figura 6). Os ddNTPs diferem dos dNTPs por conterem um hidrogênio no carbono 3' ao invés de um grupo hidroxila (OH) e são marcados com corante de cor diferente e específica (FARRELL, *et al.* 2015).

Figura 6 – Dideoxinucleotídeo e desoxinucleotídeo.

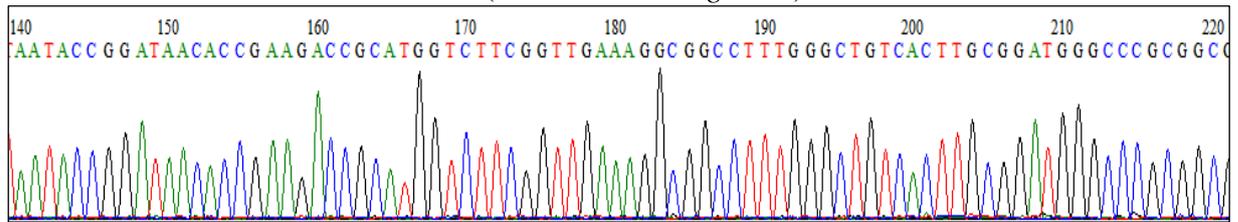


Fonte: CLARK *et al.*, 2019.

Esses nucleotídeos modificados, quando integrados em uma sequência, impedem a DNA polimerase de adicionar novos nucleotídeos. Devido à falta da molécula de oxigênio no carbono 3', a DNA polimerase não consegue fazer a ligação dessa parte da molécula com o grupo fosfato do nucleotídeo seguinte, resultando na interrupção da reação. A adição de ddNTPs em baixas concentrações leva à geração de inúmeros fragmentos de DNA com diferentes tamanhos de extensão de acordo com o momento de incorporação do nucleotídeo modificado (HEATHER; CHAIN, 2016).

Ao final de vários ciclos de replicação do DNA alvo, a extremidade de cada fragmento é marcada com corantes específicos, indicando o nucleotídeo final. Os fragmentos são lidos por um detector de fluorescência que, devido aos corantes específicos de cada ddNTP, consegue produzir a sequência original do DNA alvo. O resultado é apresentado através de um gráfico chamado eletroferograma (Figura 7) (CLARK *et al.*, 2019).

Figura 7 - Eletroferograma apresentando o resultado do sequenciamento de DNA da amostra LP9 (*Weizmannia coagulans*)



Fonte: Autora (2022).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 COLETA DE AMOSTRAS

Foram analisadas seis diferentes marcas comerciais de leite em pó integral, todas no início do prazo de validade, produzidas no Rio Grande do Sul em um laboratório prestador de serviços. Dessas marcas, foram escolhidas aleatoriamente 14 amostras de leite em pó entre setembro/2020 e setembro/2021. As amostras coletadas foram analisadas quanto à presença de micro-organismos esporulados aeróbios (mesófilos e termófilos) e anaeróbios (mesófilos e termófilos). A quantidade de amostras de cada marca analisada está apresentada na Tabela 2.

Tabela 2 – Quantidade de amostras analisadas por marca

Marca	Quantidade de amostras
A	2
B	4
C	3
D	2
E	2
F	1

Fonte: Autora (2022).

### 4.2 ANÁLISE DE ESPOROS BACTERIANOS EM LEITE EM PÓ

#### 4.2.1 Contagem e isolamento de esporos de bactérias aeróbias mesófilas

A análise de esporos de bactérias aeróbias mesófilas foi realizada conforme a *American Public Health Association* (APHA, 2004). Uma alíquota de 10g foi pesada em saco de *stomacher* e, em seguida, foram adicionados 90mL de água destilada, sendo considerada a diluição  $10^{-1}$ . Essa diluição inicial foi transferida para um frasco Schott de 250mL e submetida ao tratamento térmico em banho-maria a  $80,0 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$  por 12 minutos, com posterior resfriamento rápido em banho de gelo. Diluições decimais seriadas até  $10^{-3}$  foram realizadas e 1mL de cada diluição foi semeada na placa de Petri. Para obter  $10^0$  2mL da diluição inicial, foram semeadas em 5 placas de Petri. Em seguida, ágar padrão para contagem (PCA) (Oxoid) suplementado com 0,1% de amido solúvel (Synth) foi adicionado em cada placa, as quais foram incubadas a  $35^{\circ}\text{C}$  por 48h. As colônias foram contabilizadas e, da placa onde houve o crescimento de colônias isoladas, foram selecionadas até três por inspeção visual.

Posteriormente, as colônias selecionadas foram repicadas em ágar nutriente inclinado (BD) para purificação e incubadas a 35°C por 48h. Em seguida, as colônias foram transferidas para criotubos de 2mL contendo caldo infusão cérebro coração (BHI) (Oxoid), as quais foram incubadas nas mesmas condições. Após a incubação, foram adicionados 0,3mL de glicerol (Synth) e os isolados foram armazenados em freezer a  $\leq -18^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.2.2 Contagem e isolamento de esporos de bactérias aeróbias termófilas**

A análise de esporos de bactérias aeróbias termófilas foi realizada conforme a *American Public Health Association* (APHA, 2015b). A alíquota de 10g foi pesada em saco de *stomacher* e, em seguida, foram adicionados 90mL de solução de hidróxido de sódio 0,02N, sendo considerada a diluição  $10^{-1}$ . Essa diluição inicial foi transferida para um frasco Schott de 250mL e submetida ao tratamento térmico em autoclave a  $108,4 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos, com posterior resfriamento rápido em banho de gelo. Diluições decimais seriadas até  $10^{-3}$  foram realizadas e 1mL de cada diluição foi semeada na placa de Petri. Para obter  $10^0$  2mL da diluição inicial, foram semeadas em 5 placas de Petri. Em seguida, ágar dextrose triptona (DTA) (Oxoid) foi adicionado em cada placa, as quais foram incubadas a  $55^{\circ}\text{C} \pm 1,0^{\circ}\text{C}$  por  $48 \pm 3\text{h}$ . As colônias foram contabilizadas e, da placa onde houve o crescimento de colônias isoladas, foram selecionadas até três por inspeção visual. Posteriormente, as colônias selecionadas foram repicadas em ágar nutriente inclinado (BD) para purificação e incubadas a 55°C por 48h. Em seguida, as colônias foram transferidas para criotubos de 2mL contendo caldo infusão cérebro coração (BHI) (Oxoid), as quais foram incubadas nas mesmas condições. Após a incubação, foram adicionados 0,3mL de glicerol (Synth) e os isolados foram armazenados em freezer a  $\leq -18^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.2.3 Contagem e isolamento de esporos de bactérias anaeróbias mesófilas**

A análise de esporos de bactérias anaeróbias mesófilas foi realizada conforme a *American Public Health Association* (APHA, 2015a), com modificações para a realização de um método por contagem em placas. A alíquota de 10g foi pesada em saco de *stomacher* e, em seguida, 90mL de água destilada foram adicionados, sendo considerada a diluição  $10^{-1}$ . Essa diluição inicial foi transferida para um frasco Schott de 250mL e submetida ao tratamento térmico em banho-maria a  $80,0 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos, com posterior resfriamento rápido em banho de gelo. Diluições decimais seriadas até  $10^{-3}$  foram realizadas e 1mL de cada diluição foi

semeada na placa de Petri. Para obter  $10^0$  2mL da diluição inicial, foram semeadas em 5 placas de Petri. Em seguida, ágar clostridial reforçado (RCA) (Oxoid) foi adicionado em cada placa, as quais foram incubadas com gerador de anaerobiose (Biomérieux) em jarra a  $35^\circ\text{C}$  por 120h. As colônias foram contabilizadas e, da placa onde houve o crescimento de colônias isoladas, foram selecionadas até três por inspeção visual. Posteriormente, as colônias selecionadas foram repicadas para criotubos de 2mL com meio reforçado para clostridium (RCM) (Oxoid), adicionando uma gota de óleo mineral estéril (Laborclin) para gerar anaerobiose. Os criotubos foram incubados a  $37^\circ\text{C}$  por 120h. Nos tubos que apresentaram crescimento, foram adicionados 0,3mL de glicerol (Synth) e os isolados foram armazenados em freezer a  $\leq -18^\circ\text{C}$ .

#### **4.2.4 Contagem e isolamento de esporos de bactérias anaeróbias termófilas**

A análise de esporos de bactérias anaeróbias termófilas foi realizada conforme a *American Public Health Association* (APHA, 2015c), com modificações para a realização de um método por contagem em placas. A alíquota de 10g foi pesada em saco de *stomacher* e, em seguida, foram adicionados 90mL de água destilada, sendo considerada a diluição de  $10^{-1}$ . Essa diluição inicial foi transferida para um frasco Schott de 250mL e submetida ao tratamento térmico em banho-maria até a fervura, quando se iniciou a contagem de 5min, com posterior resfriamento rápido em banho de gelo. Diluições decimais seriadas até  $10^{-3}$  foram realizadas e 1mL de cada diluição foi semeada na placa de Petri. Para obter  $10^0$  2mL da diluição inicial, foram semeadas em 5 placas de Petri. Em seguida, ágar RCA (Oxoid) foi adicionado em cada placa, as quais foram incubadas com gerador de anaerobiose (Biomérieux) em jarra a  $55^\circ\text{C}$  por 72h. As colônias foram contabilizadas e, da placa onde houve o crescimento de colônias isoladas, foram selecionadas até três por inspeção visual. Posteriormente, as colônias selecionadas foram repicadas para criotubos de 2mL com caldo RCM (Oxoid), adicionando uma gota de óleo mineral estéril (Laborclin) para gerar anaerobiose. Os criotubos foram incubados a  $55^\circ\text{C}$  por 72h. Nos tubos que apresentaram crescimento, foram adicionados 0,3mL de glicerol (Synth) e os isolados foram armazenados em freezer a  $\leq -18^\circ\text{C}$ .

#### **4.3 MATERIAL DE REFERÊNCIA**

Como garantia da qualidade dos ensaios, utilizou-se como padrão o material de referência (MR) *Spore Reference* (RM4290) da IFM Quality Services Pty Ltd (Ingleburn, Austrália) (Figura 8), que consiste em alíquotas de leite em pó contaminadas com esporos bacterianos em paralelo às 10 primeiras amostras analisadas. O padrão foi submetido ao mesmo procedimento analítico das amostras para posterior comparação entre o valor obtido com o esperado, fornecido pelo provedor para cada tipo de esporo.

Figura 8 - Material de referência Spore IFM RM 4290 utilizado nos ensaios comparativos de esporos aeróbios e anaeróbios, mesófilos e termófilos.



Fonte: Autora (2022).

#### 4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para verificar se houve diferença significativa entre o valor de referência fornecido pelo provedor e o valor obtido nas amostras padrão de leite em pó analisadas, utilizou-se ANOVA com 95% de confiança através do Excel v.12.0.

#### 4.5 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS

##### 4.5.1 Extração e purificação de DNA

Para a identificação, os isolados foram ativados em placas de ágar nutriente. Após o crescimento nas placas, foi realizada a etapa de extração e de purificação do DNA com o kit comercial DPK-116S - *Bacteria DNA preparation kit columns-based spin column based genomic DNA purification from bacteria*, da marca Cellco Biotec do Brasil Ltda (São Paulo, Brasil). Para a lise celular, 500µL do caldo de cultura foi adicionado a um microtubo tipo Eppendorf estéril de 2mL e centrifugado a 10.000g por um minuto, sendo descartado o sobrenadante. Foi adicionado 50µL da mistura enzimática e agitado por 60 segundos, momento no qual a solução foi incubada a 37°C por 10 minutos. Posteriormente, foi adicionado 300µL do tampão de lise e 8µL da proteinase K, misturado por pipetagem, incubado a 60°C por 10 minutos e seguido para banho de gelo por cinco minutos. Para ocorrer a ligação do DNA, foi adicionado 300µL do tampão de ligação e agitado brevemente, os tubos foram resfriados no gelo por cinco minutos e, em seguida, centrifugados por 5 minutos a 10.000g.

Na etapa de ativação, foi colocada uma coluna de *spin* em um microtubo tipo Eppendorf estéril de 2mL, adicionou-se 100µL do tampão de ativação na coluna *spin*, sendo centrifugado a 10.000g por 30 segundos e descartada a sobra. Em seguida, foi pipetado o sobrenadante do tampão de ligação diretamente na coluna *spin* e centrifugado por um minuto, a 10.000g. Para a lavagem, foi adicionado 500µL do tampão de lavagem na coluna *spin* e centrifugado por 30 segundos a 10.000g, sendo que a sobra foi descartada. Após a lavagem, a coluna *spin* foi transferida para um novo microtubo tipo Eppendorf estéril de 1,5mL para a etapa de eluição do DNA. Foi adicionado 50µL do tampão de eluição no centro da coluna *spin* e incubado em temperatura ambiente por um minuto. Após a incubação, o tubo foi centrifugado a 10.000g por dois minutos e a coluna *spin* foi descartada, deixando o DNA no microtubo.

#### **4.5.2 Amplificação do gene 16S rRNA pela reação em cadeia da polimerase (PCR)**

Para a realização da PCRm utilizou-se o kit conjunto para PCR MasterMix da Ludwig Biotecnologia. A mistura de reação contém Taq DNA Polimerase recombinante, MgCl<sub>2</sub> e desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTPs). Os *primers* universais utilizados foram *forward* 27 (5'-GAGTTTGATCATGGCTCAG-3') e *reverse* 1492 (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'), conforme sequência de referência NCBI: NR\_024570.1, sintetizados pela empresa gbt Oligos (Buenos Aires, Argentina). As reações contendo 1,5µL de DNA, 1,25µL de cada primer, 12,5µL do MasterMix e completadas com 8,5µL água livre de DNases foram levadas ao

termociclador (QuantStudio 5, ThermoFisher Scientific) com as seguintes condições: 94°C por 5 minutos; 30 ciclos a 94°C por 30 segundos cada; 55°C por 30 segundos; 72°C por 1 minuto; e, por fim, 72°C por 5 minutos, conforme descrito por Zhang e You (2018). Os amplicons foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% e as bandas foram visualizadas em transiluminador UV.

#### 4.5.3 Sequenciamento e análise das sequências

Os produtos de PCR obtidos foram enviados para a ACTGene Análises Moleculares, onde foram purificados com o kit ExoSAP-IT™ (Thermo Fisher, Santa Clara, CA, USA), quantificados em Nanodrop e sequenciados pelo método Sanger em sequenciador automático (AB 3500, Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) com os mesmos *primers forward 27* e *reverse 1492*, com geração de aproximadamente 700 nucleotídeos em cada sequência.

A qualidade das sequências foi analisada nos *softwares* Bioedit e Chromas. As sequências consenso geradas foram comparadas com outras depositadas no GenBank utilizando o programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool* – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) para busca de similaridades. Somente isolados nos quais as sequências de 16S rRNA apresentaram similaridades  $\geq 97\%$  com as sequências das bases de dados foram considerados pertencentes a uma determinada espécie (STACKEBRANDT; GOEBEL, 1994).

### 4.6 CONSTRUÇÃO DA ÁRVORE FILOGENÉTICA

#### 4.6.1 Alinhamento e *outgroup*

A sequência de DNA correspondente à subunidade ribossomal 16S do organismo *Aquifex aeolicus* da linhagem VF5, uma bactéria Gram-negativa e hipertermofílica, foi obtida no banco de dados NCBI (número de acesso NR\_075056.2) para utilização como *outgroup* nas análises filogenéticas. A sequência do *outgroup*, em conjunto com as sequências de todas as amostras, foi alinhada com o algoritmo ClustalW, disponível no *software* MEGA v.11, sendo mantidos os parâmetros padrões da ferramenta.

#### 4.6.2 Análises filogenéticas

A árvore foi construída a partir do método de *Neighbor-joining* por meio do *software* MEGA v.11. Para a análise, utilizou-se o modelo evolutivo de substituição nucleotídica de Kimura-2-parâmetros. A confiabilidade dos nós foi avaliada através de 1000 replicações de *Bootstrap*.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No período entre setembro/2020 e setembro/2021, foram coletadas e analisadas 14 amostras de leite em pó integral, no início do prazo de validade, de seis diferentes marcas produzidas no Rio Grande do Sul com o objetivo de quantificar e de identificar os grupos de micro-organismos esporulados presentes na microbiota do leite em pó.

### 5.1 QUANTIFICAÇÃO DOS ESPORULADOS

Na Tabela 3, encontram-se os resultados quantitativos dos esporos encontrados no leite em pó.

Tabela 3 – População ( $\log_{10}$  UFC/g) dos diferentes esporulados bacterianos

<b>Esporos</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>
Mesófilos aeróbios	0,78	2,82
Mesófilos anaeróbios	0,30	2,45
Termófilos aeróbios totais	1,30	4,56
Termófilos anaeróbios	0,30	3,95

Fonte: Autora (2022)

Diante dos resultados apresentados na Tabela 3, houve a contagem de esporos em todas as amostras analisadas, sendo os termófilos tanto aeróbios totais quanto anaeróbios com maior nível de contaminação, chegando a 4,56  $\log_{10}$  UFC/g e 3,95  $\log_{10}$  UFC/g, respectivamente (Apêndice A).

As contagens de esporos mesófilos aeróbios em leite em pó encontradas nesse estudo (Figura 9) são semelhantes aos resultados de Nassib *et al.* (2018), em cujo estudo um dos objetivos foi avaliar a prevalência de bactérias formadoras de esporos em leite em pó desnatado na cidade de Mansoura, no Egito. Nas 15 amostras analisadas, a contagem de esporos mesófilos aeróbios variou de 1,38 a 2,12  $\log_{10}$  UFC/g. Em outro estudo realizado em Campinas/SP por Iwase (2017), as contagens de esporos aeróbios mesófilos em leite em pó variaram de menor de 1,00 a 3,81  $\log_{10}$  UFC/g. Na região norte do Paraná, Marioto *et al.* (2020) analisaram 20 amostras de leite cru refrigerado, cujo estudo buscou quantificar os esporulados e verificar a capacidade proteolítica e lipolítica dos isolados. A contagem para esporos aeróbios foi de 1,00 a 2,40  $\log_{10}$  UFC/g e verificou-se a atividade lipolítica e proteolítica dos isolados em 61,4% e 52,08%, respectivamente.

Conforme a Instrução Normativa n. 53 (BRASIL, 2018) e a Instrução Normativa n. 161 (ANVISA, 2022), o limite de tolerância de  $1,0 \times 10^5$  ( $5,0 \log_{10}$  UFC/g ou mL) é aplicável somente para a contagem de células vegetativas de micro-organismos aeróbios mesófilos, não incluindo a contagem dos esporos, provavelmente pelo fato de a maioria dos esporulados não ter impacto na saúde pública, mas na vida de prateleira dos produtos.

Figura 9 - Mesófilos aeróbios em ágar PCA após incubação à 35°C por 48h



Fonte: Autora (2022)

As populações de esporos mesófilos anaeróbios chegaram a  $2,45 \log_{10}$  UFC/g no presente estudo (Figura 10) e não foi encontrado outro trabalho no qual houvesse a contabilização de esporos mesófilos anaeróbios em leite em pó. Um estudo conduzido por Reyes (2008) para verificar a contaminação de esporos nos ingredientes utilizados para a fabricação de requeijão cremoso mostrou que um dos itens mais contaminados foi o concentrado proteico, no qual, das 10 amostras analisadas por um método semi-quantitativo (seis tubos), sendo cinco de um lote e cinco de outro, a porcentagem de contaminação foi de 63% e 80% nos lotes avaliados. Isso indica que essa matriz é uma das responsáveis pela alta concentração dos anaeróbios mesófilos esporulados recuperados na análise do produto, onde a porcentagem de contaminação foi de 20% e 63% dos lotes avaliados.

Barash *et al.* (2010) analisaram 39 fórmulas infantis no Reino Unido com o objetivo de verificar a presença de esporos de clostrídios. Das 39 amostras, 12 apresentaram contaminação pelos esporos e o número mais provável (NMP) variou entre 1,1 e  $>23$  por 100g. Os micro-

organismos isolados com maior frequência foram identificados como *Clostridium sporogenes* e *Clostridium butyricum*, entre outras 10 espécies de clostrídios isolados a partir de amostras ambientais.

Figura 10 - Mesófilos anaeróbios em ágar RCA após incubação à 35°C por 120h



Fonte: Autora (2022).

Os esporos termófilos aeróbios chegaram a 4,56 log<sub>10</sub> UFC/g no presente estudo (Figura 11). Resultados semelhantes foram encontrados em outros estudos, como Yuan *et al.* (2012), no qual o total de 22 amostras de leite em pó fabricados na China apresentaram populações que variaram de 2,18 a 4,59 log<sub>10</sub> UFC/g. Sadiq *et al.* (2016) analisaram 25 amostras de leite em pó incluindo fórmula infantil na China e as contagens variaram de 1,00 a 4,30 log<sub>10</sub> UFC/g. O total de 28 amostras de leite em pó de 18 países diferentes foi analisado por Ruckert *et al.* (2004), sendo que esses autores obtiveram níveis populacionais variando de 0,90 a 4,70 log<sub>10</sub> UFC/g e oriundos da Alemanha e dos Estados Unidos, respectivamente.

Figura 11 - Termófilos aeróbios em ágar DTA após incubação à 55°C por 48h



Fonte: Autora (2022).

Comparando os valores obtidos para esporos termófilos aeróbios nas amostras de leite em pó com os limites estabelecidos internacionalmente, verificou-se que 8 das 14 amostras analisadas apresentaram resultados acima dos padrões internacionais, conforme Tabela 4.

Tabela 4 – Resultado da contagem de esporos termófilos aeróbios para 8 amostras de leite em pó em comparação com os limites de tolerância estabelecidos internacionalmente

Amostra	Contagem	Council (EUA)	FSAI (Irlanda)	China
LP2	$1,7 \times 10^3$ *			
LP3	$1,6 \times 10^4$			
LP5	$3,6 \times 10^4$			
LP6	$1,2 \times 10^3$ *	$<5 \times 10^2$	$<10^4$	$10^3$
LP7	$3,5 \times 10^4$			
LP8	$1,1 \times 10^4$			
LP9	$1,7 \times 10^4$			
LP10	$5,0 \times 10^3$ *			

\*Somente para Council e China

Fonte: Autora (2022); WATTERSON *et al.*, 2014; YUAN *et al.*, 2012

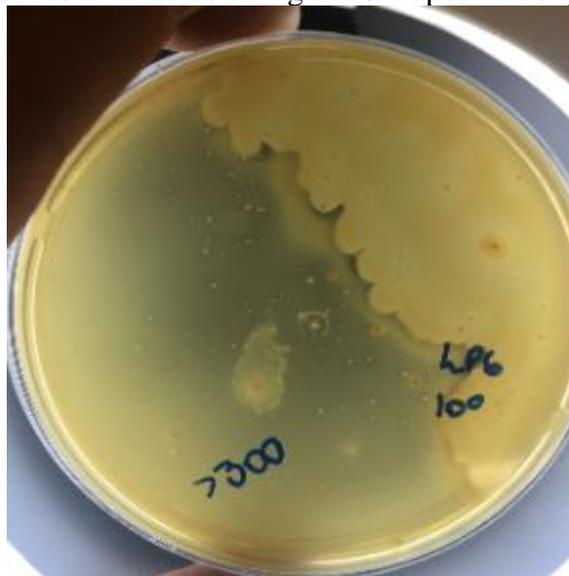
Considerando que a maioria das amostras apresentou resultado insatisfatório para esporos termófilos aeróbios segundo os padrões internacionais, esse estudo indica que há a necessidade de direcionamento específico para um maior controle de esporos termófilos nas plantas de processamento. Devido à alta resistência ao calor por esse tipo de esporo, é preciso uma maior compreensão da proliferação, da sobrevivência e da estrutura de biofilmes para desenvolver medidas de controle e reduzir as altas contagens. Esse estudo contribui para a compilação de dados, considerando uma futura proposta para estabelecer um padrão na

legislação brasileira para esporos termófilos aeróbios. No entanto, mais estudos precisam ser realizados em diferentes regiões e com uma amostragem maior.

As contagens de esporos termófilos anaeróbios chegaram a 3,95 log<sub>10</sub> UFC/g no presente estudo (Figura 12). Em uma pesquisa conduzida por Reyes (2008) em um produto lácteo similar, verificou-se a contaminação de termófilos anaeróbios em concentrado proteico utilizado como ingrediente para a produção de requeijão. O método utilizado foi o semi-quantitativo (seis tubos) e a contaminação atingiu aproximadamente 60% de tubos positivos nas 10 amostras analisadas.

Até o presente momento, não foi encontrado outro trabalho na literatura que tenha contabilizado esporos anaeróbios em leite em pó tanto mesófilos quanto termófilos. Nesse estudo, foi utilizada a metodologia APHA (2015a; 2015c), adaptada para semeadura em placa, tornando o método quantitativo e não a técnica de número mais provável, como cita a metodologia oficial, através da qual é estimada a densidade populacional através de tubos positivos. A técnica oficial torna o método semi-quantitativo, ou seja, de difícil interpretação, uma vez que o cliente necessita de dados quantitativos (UFC/g ou mL) ao invés de porcentagens de tubos positivos. Devido à diferença metodológica, as duas técnicas não são comparáveis. A técnica de NMP é considerada mais sensível pois não exige a formação da colônia, o que pode ser uma limitação para micro-organismos que se encontram injuriados.

Figura 12 - Termófilos anaeróbios em ágar RCA após incubação à 55°C por 72h

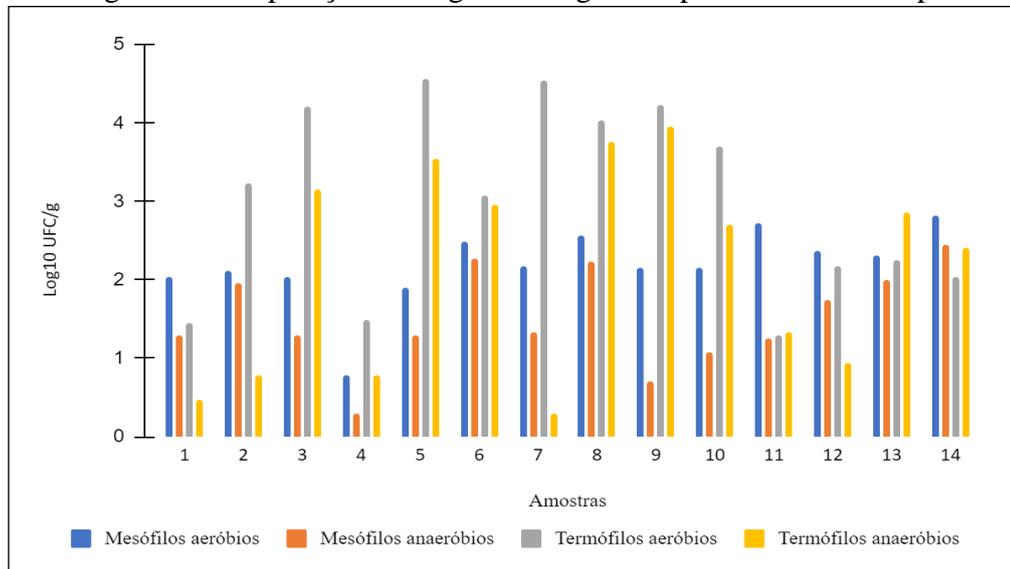


Fonte: Autora (2022).

A Figura 13 apresenta o nível de contaminação de esporos nas amostras de leite em pó. Níveis populacionais de esporos mesófilos e termófilos (aeróbios/anaeróbios) foram obtidos

em todas as amostras, indicando que a contaminação é frequente para todos os esporos analisados; porém, são os termófilos que apresentam os maiores índices.

Figura 13 – População em log<sub>10</sub> UFC/g dos esporos em leite em pó



Fonte: Autora (2022).

Essa condição é explicada porque a proliferação de bacilos termofílicos é selecionada devido a uma sequência de tratamentos térmicos, especialmente durante a pasteurização, a evaporação e a secagem, em cujas etapas as temperaturas variam de 80 a 180°C (VERDURMEN *et al.*, 2003). Esporos de bactérias termofílicas são altamente resistentes ao calor, apresentando um valor D<sub>121,1°C</sub> de 4-5 minutos e valor Z entre 7,8 e 12,2°C (*Geobacillus* sp.). O valor D corresponde ao tempo necessário, a uma dada temperatura, para reduzir um ciclo logarítmico no total de esporos e o valor Z é definido como a variação de temperatura necessária para que ocorra a redução de um ciclo logarítmico no valor D (STUMBO, 1973).

Algumas espécies de bacilos mesofílicos, como *B. licheniformis*, crescem em uma ampla faixa de temperatura, podendo ser detectados em condições utilizadas para o crescimento de micro-organismos termofílicos (55°C). Nesse estudo, a identificação de *B. licheniformis* foi através do método mesofílico, mas os isolados contabilizados no método termofílico que não foram identificados a nível de espécie através do gene 16S rRNA podem ser de alguma espécie mesofílica inserida na condição de crescimento em ampla faixa de temperatura. Isso pode contribuir com os maiores índices de termófilos encontrados nas amostras e é possível que essa condição indique uma limitação da metodologia.

A variação entre métodos aplicados considerando a temperatura de tratamento pode levar a grandes diferenças na contagem de esporos em leite em pó (KENT, 2016). Exemplos de outros métodos para esporos termófilos, não aplicados nesse estudo, incluem aqueles para esporos altamente resistentes ao calor, nos quais o tratamento térmico é de 100°C por 30 minutos (SCHELDEMAN *et al.*, 2005) e de 106°C por 30 minutos, sendo selecionados os esporos especialmente termorresistentes de bactérias termofílicas (ISO-IDF, 2009).

Todos os métodos apresentam estratégias semelhantes: choque térmico por um tempo específico para eliminar células vegetativas com posterior plaqueamento em ágar de recuperação não seletivo. A escolha do ágar aliado com a incubação pode contribuir na variabilidade da contagem de esporos. Watterson *et al.* (2014) analisaram amostras de leite em pó para contabilização de esporos termófilos aplicando dois tratamentos térmicos diferentes: 80°C por 12 minutos e 100°C por 30 minutos, com incubação das placas a 55°C. Os resultados mostraram que o tratamento a 80°C por 12 minutos apresentou quase duas vezes mais amostras com crescimento de esporos termofílicos, indicando que esses testes não transmitem as mesmas informações e não são comparáveis. Os autores recomendam que os laticínios adotem mais de um método padronizado para captar a diversidade de bactérias formadoras de esporos. Provavelmente isso se deve ao fato de que os esporos apresentam resistências diferentes entre as espécies, de modo que o tratamento térmico utilizado na análise interfere diretamente nas espécies que serão contabilizadas e identificadas.

Outra condição para as altas contagens de esporos termofílicos é a capacidade que algumas espécies têm de formar biofilmes, que podem proteger tanto os esporos quanto as células vegetativas durante a higienização da indústria. Os biofilmes podem ser definidos como uma comunidade de micro-organismos unidos por uma matriz polimérica produzida por eles e ligados a uma superfície, onde se multiplicam com eventual dispersão e deslocamento de células do biofilme, incluindo os esporos. *Geobacillus* sp. e *Anoxybacillus* sp. podem formar biofilmes provenientes de células vegetativas ou de esporos que se ligaram a equipamentos de aço inoxidável e superfícies dentro da linha de processamento (TEH *et al.*, 2014).

Os esporos termofílicos tendem a aumentar em número durante o processamento do leite em pó, principalmente onde há uso contínuo de equipamentos e onde o saneamento não é realizado adequadamente. A multiplicação pode ocorrer em pasteurizadores e evaporadores devido à temperatura em que operam (SCOTT *et al.*, 2007).

Estudos têm mostrado que o grau de contaminação de bacilos termófilos em produtos lácteos muitas vezes não está relacionado com a qualidade do leite cru. Quando uma baixa concentração (<1 log<sub>10</sub> UFC/mL) de esporos é introduzida na linha de processamento através

do leite cru, ela não pode levar à contaminação com contagens de células maiores que  $10^6 \log_{10}$  UFC/g, a não ser que seja dada a chance de essa célula residir e se proliferar durante as etapas do processamento. Foi verificado que as bactérias presentes nas incrustações após a limpeza no local (CIP) estavam predominantemente na forma de esporos, sugerindo que a incrustação pode ser uma possível fonte de esporos e contaminar os produtos de concentrados lácteos (SCOTT *et al.*, 2007).

Burgess *et al.* (2014) estudaram 10 cepas de *G. stearothermophilus* e uma espécie de *Anoxybacillus* isoladas de uma fábrica de leite em pó e concluíram que as cepas apresentavam a capacidade de produzir esporos a partir de biofilmes. Um estudo mostrou que esporos de *A. flavithermus* sp. e *Geobacillus* sp. foram detectados ( $>1 \log_{10}$  UFC/g) no leite em pó após 9 horas de processamento e atingiram níveis de até  $10^4 \log_{10}$  UFC/g no evaporador após 18 horas (SCOTT *et al.*, 2007). Além disso, Murphy *et al.* (1999) relataram que o crescimento de termófilos foi detectado em um evaporador de leite após um tempo de corrida de 4 horas e aumentou 100 vezes durante uma corrida de 14 horas. Burgess *et al.* (2009) mostraram que espécies de termófilos formadores de esporos aderiam facilmente a superfícies de aço inoxidável, formando biofilmes maduros de  $>10^6$  células por  $\text{cm}^2$  em apenas 6 horas e atingindo um estado estacionário após 8 horas.

A presença de bacilos termofílicos em produtos lácteos é um indicador de má higiene e contagens altas são inaceitáveis, uma vez que pode levar a defeitos causados pela produção de enzimas, como proteinases, lipases e ácidos capazes de estragar o produto. De acordo com o *Food and Drug Administration* (FDA), juntamente com os psicrotróficos, os micro-organismos termófilos e as bactérias formadoras de esporos constituem a maior ameaça à deterioração de produtos lácteos (BUEHNER *et al.*, 2014). A capacidade de detectar e de identificar rapidamente essas bactérias representaria uma vantagem econômica, bem como uma garantia de higiene para os consumidores.

## 5.2 MATERIAL DE REFERÊNCIA

O uso de materiais de referência (MR) é uma das principais ferramentas utilizadas para a garantia e o controle da qualidade dos resultados obtidos nos laboratórios de microbiologia de alimentos (BRANDÃO *et al.*, 2013) e serve principalmente para a confiabilidade e a comparabilidade entre as medições. Para garantir a qualidade das análises na recuperação dos esporos presentes nas amostras de leite em pó, foi utilizado como padrão o MR *Spore Reference*, que foi submetido ao mesmo procedimento analítico das amostras. O valor obtido

foi comparado ao valor fornecido pelo provedor para cada tipo de esporo (Apêndice C) e os valores médios das populações se encontram na Tabela 5.

Tabela 5 - Valores médios do MR e valores médios obtidos para 10 alíquotas de MR submetidas ao mesmo procedimento analítico das amostras de leite em pó para cada tipo de esporo

Tipo de esporo	Valores médios da referência (log10 UFC/g)*	Valores médios obtidos (log10 UFC/g)
Mesófilos aeróbios	4,36	4,26
Mesófilos anaeróbios	3,11	3,98
Termófilos aeróbios	3,04	3,08
Termófilos anaeróbios.	3,18	3,23

\*Valores fornecidos pelo provedor (Apêndice C).

Fonte: Autora (2022).

Para comparar se houve diferença entre as contagens da referência e as obtidas após o procedimento analítico para cada tipo de esporo, procedeu-se com o teste ANOVA, com nível de significância de 95% para um único fator. O valor F (6.468828) foi menor que o F-crítico (6.591382), o que revela que não houve diferença significativa entre as contagens. Observou-se nesse estudo que o uso do MR é uma das formas para garantir a qualidade do resultado. Assim, a adaptação realizada no método de inoculação em profundidade para anaeróbios atingiu níveis na mesma ordem logarítmica do valor de referência.

### 5.3 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS

No presente trabalho, foram obtidos 47 isolados de bactérias formadoras de esporos para o sequenciamento do 16S rRNA (Apêndice B). Ele permitiu identificar 17 (36,17%) espécies dos 47 isolados através da comparação com outras sequências depositadas no GenBank utilizando o programa BLAST. Outras 21 (44,68%) cepas tiveram sua identificação em nível de gênero e 9 (19,15%) apresentaram baixa qualidade no eletroferograma, sendo que essas sequências não foram utilizadas na identificação, conforme a Tabela 6.

Tabela 6 – Identificação por sequenciamento do gene 16S rRNA das bactérias formadoras de esporos

Identificação	Identidade de nucleotídeos (%)*	(n)	(%)
<i>Weizmannia coagulans</i>	98,38 a 100	8	21
<i>Anoxybacillus flavithermus</i>	100	2	5,3
<i>Clostridium butyricum</i>	99,2 e 99,73	2	5,3
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99,30	1	2,6
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	100	1	2,6
<i>Clostridium pabulibutyricum</i>	100	1	2,6
<i>Clostridium sporosphaeroides</i>	100	1	2,6
<i>Bacillus licheniformis</i>	100	1	2,6
<i>Bacillus</i> sp.	97,14 a 100	13	34,2
<i>Geobacillus</i> sp.	97,85 a 100	6	15,8
<i>Clostridium</i> sp.	100	2	5,3

\* Percentual de identidade baseada no alinhamento das sequências obtidas com as depositadas no GenBank utilizando a ferramenta BLAST.

Fonte: Autora (2022).

Conforme as Tabelas 6 e 7, o gênero *Bacillus* predominou nos isolados identificados, seguido dos gêneros *Weizmannia*, *Geobacillus*, *Clostridium* e *Anoxybacillus*. No entanto, a técnica de sequenciamento do gene 16S rRNA não conseguiu discriminar todos os isolados a nível de espécie. Conforme Wang e Ash (2015), a análise filogenética baseada em dados de um único gene (gene 16S rRNA, *GyrB*, *AroE*) é incapaz de distinguir claramente as espécies de *Bacillus* pois, entre algumas espécies do gênero, há um alto nível de homologia entre as sequências do gene 16S rRNA, fornecendo resolução insuficiente para a identificação a nível de espécie.

A análise das sequências examinadas do gene 16S rRNA para os isolados identificados a nível de gênero agrupou todas as sequências e forneceu baixa resolução entre cada cepa. Uma das alternativas citadas por Wang e Ash (2015) para melhorar a identificação de *B. cereus*, por exemplo, foi utilizar o método de análise baseado na filogenia do genoma completo de *Bacillus* por perfis de frequência de recursos (FFP - "*feature frequency profile*"). Com isso, os dados combinados de sequência genômica e plasmidial que não podem ser identificados em análises de sequências de um único gene específico fornecem maior resolução quanto à especiação.

A alta prevalência do gênero *Bacillus* sp. pode ser atribuída à contaminação por fontes agrícolas, incluindo solo e silagem, e fontes internas durante o processamento de laticínios, que permitem a permanência e a multiplicação desses micro-organismos (SCOTT *et al.*, 2007)

Tabela 7 – Gêneros identificados por sequenciamento do gene 16S rRNA das bactérias formadoras de esporos

Gênero	(n)	%
<i>Bacillus</i> sp.	15	39,4
<i>Weizmannia</i> sp.	8	21,1
<i>Geobacillus</i> sp.	7	18,4
<i>Clostridium</i> sp.	6	15,8
<i>Anoxybacillus</i> sp.	2	5,3

Fonte: Autora (2022).

Dos 38 isolados que foram identificados pelo sequenciamento do gene 16S rRNA, foi encontrada a presença de cinco gêneros, dentre os quais foi possível a identificação das espécies *B. licheniformis*, *Weizmannia coagulans*, *B. amyloliquefaciens*, *G. stearothermophilus*, *A. flavithermus*, *C. butyricum*, *C. pabulibutyricum* e *C. sporosphaeroides*. Se um número maior de colônias tivesse sido selecionado durante a inspeção visual de cada placa de ágar ou se o método utilizado para o tratamento térmico fosse diferente, é possível que a variedade de micro-organismos identificados fosse diversa. Apesar de as espécies *B. licheniformis* e *B. amyloliquefaciens* pertencerem ao grupo *Bacillus subtilis*, no qual a identificação a nível de espécie é difícil devido à alta proximidade evolutiva, foi possível essa diferenciação no presente trabalho.

Resultados semelhantes podem ser encontrados no estudo de Lücking *et al.* (2013), no qual 75% dos isolados nas amostras de leite em pó pertenciam ao gênero *Bacillus*, seguido de *Geobacillus*. As espécies dominantes identificadas foram *B. licheniformis*, *B. subtilis* e *G. stearothermophilus*. Sadiq *et al.* (2016) também detectaram a presença de *B. licheniformis*, *G. stearothermophilus* e *A. flavithermus* em amostras de fórmula infantil e de leite em pó, sendo *B. licheniformis* o isolado prevalente.

No estudo de Rückert *et al.* (2004), foram analisadas 28 amostras de leite em pó de 18 países e as espécies *A. flavithermus*, *B. licheniformis* e *G. stearothermophilus* foram os micro-organismos dominantes. Ronimus *et al.* (2003) avaliaram o leite em pó fabricado na Nova Zelândia e seus isolados foram identificados como *G. stearothermophilus* (44,2%), *A. flavithermus* (31,2%), *B. licheniformis* (18,5%) e *B. subtilis* (4,8%). Na China, um estudo feito por Yuan *et al.* (2012) mostrou que os esporulados termofílicos presentes no leite em pó naquele

país são *B. licheniformis*, *A. flavithermus* e *G. stearothermophilus*, sendo *B. licheniformis* a cepa dominante. Li *et al.* (2019) isolaram 269 bactérias esporuladas do leite em pó e a espécie *B. licheniformis* foi predominante, sendo 68% dos isolados. De outro lado, 16% eram outras espécies de *Bacillus*, 5% eram *Clostridium* spp., 3% *Geobacillus* spp. e com menor porcentagem os demais gêneros, como *Lysinibacillus* spp., *Brevibacillus* spp, *Anoxybacillus* e *Aneurinibacillus*.

Não foi encontrada outra pesquisa na qual a espécie *W. coagulans*, mais frequentemente isolada nesse estudo, assim como *B. amyloliquefaciens* e os anaeróbios *C. pabulibutyricum* e *C. sporosphaeroides*, foram isoladas em amostras de leite em pó, tornando o presente trabalho pioneiro na descrição dessas espécies como parte da microbiota esporulada do leite em pó no Brasil.

A espécie *B. licheniformis* é frequentemente isolada do leite cru e tem sido associada à deterioração de produtos lácteos (BUEHNER *et al.*, 2014), sendo que algumas cepas produzem componentes tóxicos que podem causar intoxicação alimentar e gastroenterites (MIKKOLA *et al.*, 2004). Foram relatados surtos de *B. licheniformis* transmitidos por alimentos associados a carnes, legumes cozidos, pães, leite cru e alimentos industrializados para recém-nascidos, já que a toxina produzida é termicamente estável, semelhante àquela emética produzida por *B. cereus* (SALKINOJA-SALONEN *et al.*, 1999). A presença de *B. licheniformis* no leite em pó merece atenção pois ele é um ingrediente utilizado para fórmulas infantis, de modo que a produção dessas toxinas deve ser vista como uma preocupação.

O gênero *Weizmannia* foi recentemente transferido do gênero *Bacillus* e é composto por três espécies: *W. coagulans*, *W. acidiproducens* e *W. ginsengihumi*. Cepas de *W. coagulans* foram isoladas do solo, da silagem, do leite, de conservas, do suco de tomate, da gelatina e de produtos farmacêuticos. É uma bactéria homofermentativa e produtora de ácido lático, sendo identificada pela primeira vez como um agente de deterioração de produtos lácteos (GUPTA *et al.*, 2020; YOON, 2021).

A espécie *B. amyloliquefaciens* é um contaminante usual de leite e produtos lácteos, pode causar deterioração devido à produção de ácidos ou enzimas e produzir a toxina cereulide, embora em níveis mais baixos que a espécie *B. cereus*, desempenhando um papel importante na segurança do alimento (COOREVITS *et al.*, 2008; WITTHUHN *et al.*, 2011; LÜCKING *et al.*, 2013). Lücking *et al.* (2013) relataram a sobrevivência do esporo de *B. amyloliquefaciens* após o tratamento térmico de 125°C por 30 minutos, tendo sido considerada uma espécie altamente termo resistente.

O termófilo *G. stearothermophilus* é um dos contaminantes do leite em pó mais comumente encontrado, representando até 65% dos isolados desse tipo, e estima-se que mais de 50% do leite em pó produzido no mundo está contaminado com esse micro-organismo. (COOREVITS *et al.*, 2012; DURAND *et al.*, 2015). Considerado um importante deteriorante na indústria de alimentos devido ao esporo ser altamente resistente ao calor e à capacidade de formar biofilme, é um *flat-sour* típico, formando ácido láctico a partir da glicose sem gerar gás, impedindo que a deterioração seja percebida pelo estufamento da embalagem (PUTRI, 2017).

Um micro-organismo relevante para a indústria de alimentos, a espécie *A. flavithermus* é um indicador de higiene para produtos lácteos, além de um deteriorante produtor de enzimas e ácidos que podem levar a sabores desagradáveis no produto (WAGNER; WIEGEL, 2008). Junto com *G. stearothermophilus*, são os aeróbicos termofílicos isolados de produtos lácteos em pó predominantes, apresentando uma rápida taxa de crescimento e com capacidade de formar biofilmes (ZHAO *et al.*, 2013).

Os esporos de *C. butyricum* podem contaminar os produtos lácteos através do leite contaminado a partir da fermentação incorreta da silagem. Junto com as espécies *C. tyrobutyricum*, *C. sporogenes* e *C. perfringens*, representam cerca de 75% do total da flora anaeróbica formadora dos esporos predominantes no leite cru (LOESSNER *et al.*, 1997; KOMORI *et al.*, 2019). Como deteriorantes, produzem grande quantidade de gás carbônico e hidrogênio, gerando estufamento, além de ácido butírico e acético, que dão sabores e odores desagradáveis ao alimento contaminado. Além da degradação causada em produtos lácteos, já foram relatados casos de produção de toxina botulínica por algumas cepas de *C. butyricum*. Aureli *et al.* (1986) relataram dois casos de botulismo infantil tipo E causados por uma cepa de *C. butyricum* na Itália, onde a toxina foi purificada e considerada semelhante àquela produzida por *C. botulinum*.

Assim como *C. butyricum*, a espécie *C. pabulibutyricum* é um potencial contaminante do leite cru, foi isolado da silagem e é produtor de ácido butírico e de gás a partir de açúcares e de ácido láctico, levando à degradação de produtos lácteos e principalmente ao estufamento tardio na produção de queijos semiduros e duros (KOBAYASHI *et al.*, 2017). Na etapa de padronização do processamento do queijo, pode ser feita a adição de leite em pó, tornando-o uma fonte de contaminação de esporos anaeróbios deteriorantes.

A espécie *C. sporosphaeroides* é sacarolítica, promovendo a deterioração através da acidificação devido à fermentação de açúcares e modificando as características sensoriais do alimento contaminado. Seus esporos já foram isolados de comida enlatada (WILDE *et al.*, 1997; SORIANO *et al.*, 1948).

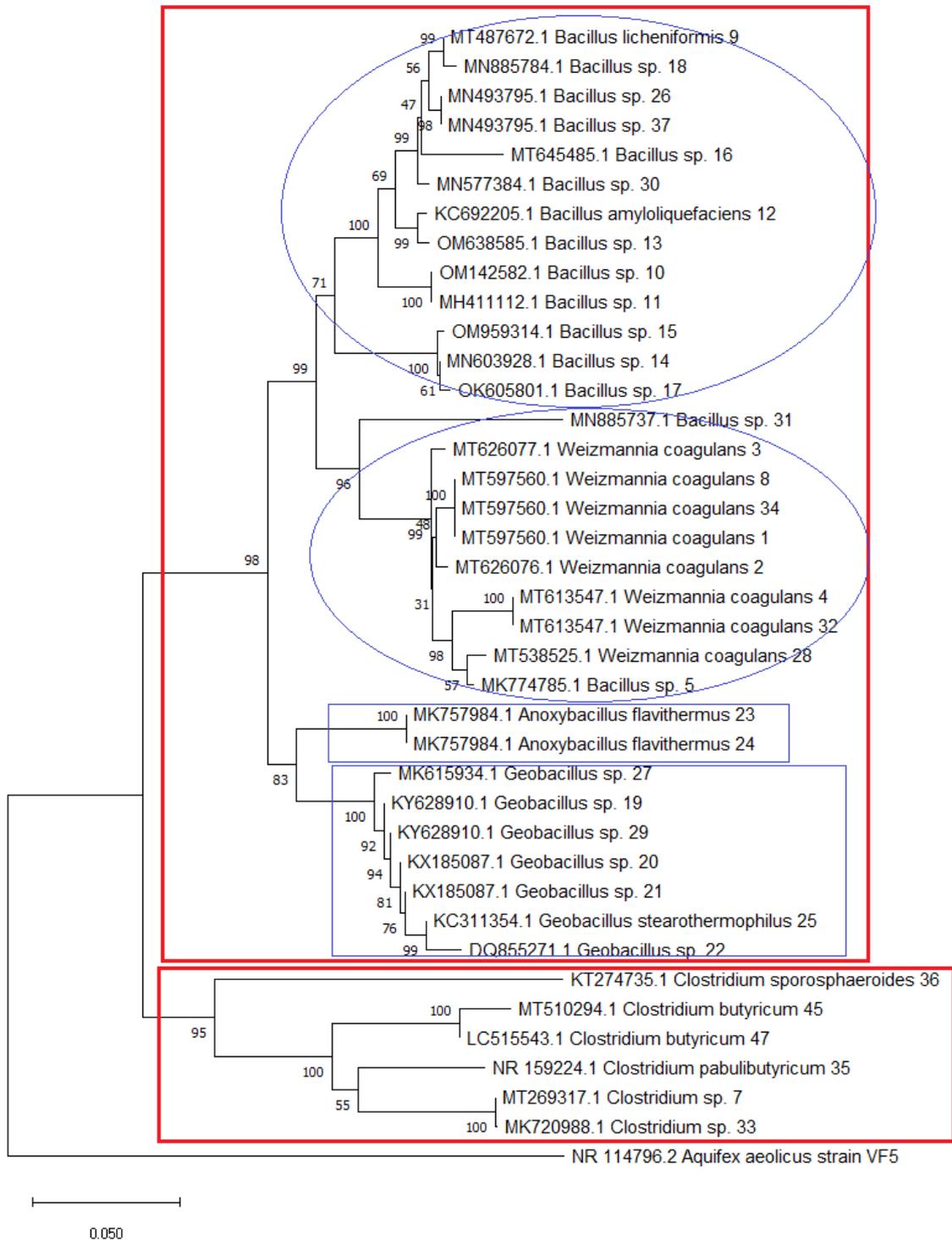
#### 5.4 CARACTERIZAÇÃO FILOGENÉTICA

Após o alinhamento das sequências, a árvore filogenética foi obtida através do método *Neighbor-joining*, empregando o *software* MEGA v.11 (Figura 14). O teste *bootstrap* ( $n = 1000$ ) foi utilizado para estimar a confiança dos galhos da árvore filogenética gerada e baseada em sequência. Valores de *bootstrap* em uma árvore filogenética indicam quantas vezes o mesmo galho será gerado em  $n$  testes com um conjunto de dados reamostrados. Esses valores podem variar de 0 a 100, indicando a probabilidade de o mesmo galho ser gerado em  $n$  vezes, e, quanto mais próximo de 100, maior a confiança na semelhança filogenética reportada entre os micro-organismos. A árvore foi construída pela aproximação de sequências com a menor distância entre elas (CALDART *et al.*, 2016).

Com base na árvore filogenética gerada pelo *software*, observa-se que ela é composta pelo filo *Firmicutes* e pelas famílias *Bacillaceae* e *Clostridiaceae*. Partindo do nó (ponto de ramificação) do ancestral comum, houve uma bifurcação em dois novos nós, sendo o primeiro um agrupamento envolvendo os gêneros *Bacillus*, *Weizmannia*, *Anoxybacillus* e *Geobacillus* e o segundo compreendendo a família *Clostridiaceae*.

Verifica-se que, no primeiro agrupamento da família *Bacillaceae*, houve uma nova bifurcação, separando os gêneros *Bacillus* e *Weizmannia*. Como no sequenciamento, muitos isolados foram identificados apenas em nível de gênero, de modo que é provável que alguns dos isolados agrupados com *B. licheniformis* e *B. amyloliquefaciens* também pertençam ao grupo *B. subtilis* por serem estreitamente relacionados às espécies identificadas. As demais pertencentes ao grupo são *B. subtilis*, *B. atrophaeus*, *B. mojavensis*, *B. sonorensis*, *B. vallismortis*, *B. pumilus*, *B. tequilensis* e *B. velezensis* (HARWOOD, 2018). As amostras 31 e 5 se provaram estreitamente relacionadas à espécie *W. coagulans*, provavelmente pelo fato de *W. coagulans* ser anteriormente classificada no gênero *Bacillus*, com o qual apresenta similaridade (GUPTA *et al.*, 2020). No outro nó da bifurcação, houve a separação da espécie *A. flavithermus* do gênero *Geobacillus*, sendo ambos termófilos.

Figura 14 - Árvore filogenética obtida a partir de sequências 16S rRNA com o método de *Neighbor-joining*. Os valores nos galhos representam o suporte do *bootstrap* para a divisão subsequente



Fonte: Autora (2022).

## 6 CONCLUSÃO

Os resultados mostraram que a contaminação por bactérias formadoras de esporos são frequentes em amostras de leite em pó e que há diversidade entre os isolados obtidos, sendo os termófilos tanto aeróbios quanto anaeróbios com maior nível de contaminação.

A adaptação realizada na metodologia *American Public Health Association* (APHA, 2015) apresentou resultado satisfatório, mostrando que não houve diferença significativa entre o método tradicional e o adaptado para a técnica quantitativa.

O processo térmico aplicado na produção do leite em pó não garante a eliminação dos esporos bacterianos. O consumo direto ou como ingrediente o torna uma fonte de contaminação para outros produtos, podendo ser um risco à segurança. No presente estudo, foi identificada a presença de espécies tanto deteriorantes (*B.licheniformis*, *W. coagulans*, *B. amyloliquefaciens*, *G. stearothermophilus*, *A. flavithermus*, *C. butyricum*, *C. pabulibutyricum* e *C. sporosphaeroides*) quanto com capacidade de produção de toxinas (*B.licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* e *C. butyricum*), podendo causar danos à saúde de consumidores e perdas econômicas às empresas.

A identificação das espécies *G. stearothermophilus* e *A. flavithermus*, que produzem esporos termorresistentes e apresentam a capacidade de formar biofilme aliado às altas populações de esporos de bacilos termófilos, sugere que os problemas de contaminação dos lotes aos quais pertenciam as amostras podem estar associados à presença de biofilmes na linha de processamento, bem como ao uso de matéria-prima com alta contagem microbiológica para a produção do leite em pó. A maioria dos micro-organismos termófilos são deteriorantes e a reconstituição desse leite em pó acompanhado de aquecimento pode propiciar a ativação dos esporos, a germinação e a multiplicação dessas bactérias, causando uma possível deterioração do produto e deixando-o em condições inadequadas ao consumo. Esse estudo descreveu pela primeira vez a detecção das espécies *W. coagulans*, *B. amyloliquefaciens*, *C. pabulibutyricum*, *C. sporosphaeroides* e *C. butyricum*, fazendo parte da microbiota esporulada do leite em pó no Brasil, bem como a quantificação de esporulados mesófilos e termófilos (aeróbios e anaeróbios).

Dessa forma, os resultados indicam a necessidade de estabelecer medidas de controle para melhorar as condições de higiene e de processamento do leite em pó, garantindo a qualidade do produto e a segurança do consumidor.

## REFERÊNCIAS

ANANDHARAMAKRISHNAN, Chinnaswamy *et al.* **Spray drying techniques for food ingredient encapsulation**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2015.

APHA. American Public Health Association. **Standard Methods for the Examination of Dairy Products**. 17. ed. Washington: [s. n.], 2004. Method 8.090.

APHA. American Public Health Association. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. Mesophilic Anaerobic Sporeformers**, 5. ed. Washington: [s. n.], 2015a. Methods 24.512 and 24.524.

APHA. American Public Health Association. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. Mesophilic Anaerobic Sporeformers**, 5. ed. Washington: [s. n.], 2015b. Methods 24.512 and 24.524.

APHA. American Public Health Association. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. Thermophilic Anaerobic Sporeformers**, 5. ed. Washington: [s. n.], 2015c. Method 24.524.

AURELI, Paolo *et al.* Two cases of type E infant botulism caused by neurotoxigenic *Clostridium butyricum* in Italy. **Journal of Infectious Diseases**, v. 154, n. 2, p. 207-211, 1986.

BARASH, Jason R.; HSIA, Jennifer K.; ARNON, Stephen S. Presence of soil-dwelling clostridia in commercial powdered infant formulas. **The Journal of Pediatrics**, v. 156, n. 3, p. 402-408, 2010.

BELOTI, Vanerli *et al.* **Leite: obtenção, inspeção e qualidade**. Londrina: Planta, 2015.

BHANDARI, Vaibhav *et al.* Molecular signatures for *Bacillus* species: demarcation of the *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus* clades in molecular terms and proposal to limit the placement of new species into the genus *Bacillus*. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 63, n. 7, p. 2712-2726, 2013.

BRANDÃO, Marcelo Luiz Lima *et al.* Desenvolvimento de material de referência para microbiologia de alimentos contendo estafilococos coagulase positiva em matriz queijo. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 16, p. 73-79, 2013.

BRASIL. Decreto n. 9.013, de 29 de março de 2017. Regulamenta a Lei n. 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei n. 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. *In: Diário Oficial da União*, Brasília, 30 de março de 2017. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/aquicultura-e-pesca/legislacao/legislacao-geral-da-pesca/decreto-no-9-013-de-29-03-2017.pdf/view>. Acesso em: 07 ago. 2022.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 53 de 1º de outubro de 2018. *In: Diário Oficial da União*, Brasília, 02 de outubro de 2018. Disponível em: <https://www.in.gov.br/materia/>

/asset\_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/45374372/do1-2018-10-16-instrucao-normativa-n-53-de-1-de-outubro-de-2018-45374042. Acesso em: 07 ago. 2022.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 76 de 26 de novembro de 2018. *In: Diário Oficial da União*, Brasília, 30 de novembro de 2018. Disponível em: <https://wp.ufpel.edu.br/inspleite/files/2019/04/INSTRU%C3%87%C3%83O-NORMATIVA-N%C2%BA-76-DE-26-DE-NOVEMBRO-DE-2018-Di%C3%A1rio-Oficial-da-Uni%C3%A3o-Imprensa-Nacional.pdf>. Acesso em: 07 ago. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instrução Normativa n. 161 de 1º de julho de 2022. *In: Diário Oficial da União*, Brasília, 6 de julho de 2022.

BUEHNER, Kimberly P.; ANAND, Sanjeev; GARCIA, Alvaro. Prevalence of thermophilic bacteria and spores on 10 Midwest dairy farms. *Journal of dairy science*, v. 97, n. 11, p. 6777-6784, 2014.

BURGESS, Sara A. *et al.* The formation of spores in biofilms of *Anoxybacillus flavithermus*. *Journal of applied microbiology*, v. 107, n. 3, p. 1012-1018, 2009.

BURGESS, Sara A.; LINDSAY, Denise; FLINT, Steve H. Biofilms of thermophilic bacilli isolated from dairy processing plants and efficacy of sanitizers. *Methods Mol Biol*, v. 1147, p. 367-377, 2014.

CARIC, M.; AKKERMAN, J.C.; MILANOVIC, S.; KENTISH, S.E.; TAMIME, A.Y. Technology of evaporators, membrane processing and dryers. *In: TAMIME, A.Y. (Org.). Dairy Powders and Concentrated Products*. Oxford: Blackwell Publishing Ltd., 2009. p. 99-148.

CALDART, Eloiza Teles *et al.* Análise filogenética: conceitos básicos e suas utilizações como ferramenta para virologia e epidemiologia molecular. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 44, p. 1-20, 2016.

CHRISTIANSSON, A.; BERTILSSON, J.; SVENSSON, B. *Bacillus cereus* spores in raw milk: factors affecting the contamination of milk during the grazing period. *Journal of Dairy Science*, v. 82, p. 305-314, 1999.

CHOWDHURY PAUL, Sangita *et al.* Induction of Cr (VI) reduction activity in an *Anoxybacillus* strain under heat stress: a biochemical and proteomic study. *FEMS microbiology letters*, v. 331, n. 1, p. 70-80, 2012.

CHRISTOFF, Ana Paula. **Utilizando marcadores moleculares para identificação de micro-organismos**. Florianópolis: Neoprospecta, 2016. [dispositivo eletrônico]

CHUNG, Young Ryun *et al.* *Paenibacillus koreensis* sp. nov., a new species that produces an iturin-like antifungal compound. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 50, n. 4, p. 1495-1500, 2000.

CLARK, M. A.; DOUGLAS M.; CHOI, J. *Biology 2e*. Texas: OpenStax, 2019.

COOREVITS, An *et al.* Taxonomic revision of the genus *Geobacillus*: emendation of *Geobacillus*, *G. stearothermophilus*, *G. jurassicus*, *G. toebii*, *G. thermodenitrificans* and *G. thermoglucosidans* (nom. corrig., formerly ‘thermoglucosidasius’); transfer of *Bacillus thermantarcticus* to the genus as *G. thermantarcticus* comb. nov.; proposal of *Caldibacillus debilis* gen. nov., comb. nov.; transfer of *G. tepidamans* to *Anoxybacillus* as *A. tepidamans* comb. nov.; and proposal of *Anoxybacillus caldiproteolyticus* sp. nov. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 62, n. 7, p. 1470-1485, 2012.

COOREVITS, An *et al.* Comparative analysis of the diversity of aerobic spore-forming bacteria in raw milk from organic and conventional dairy farms. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 31, n. 2, p. 126-140, 2008.

CRUZ, Adriano Gomes da; ZACARCHENCO, Patrícia Blumer; OLIVEIRA, Carlos Augusto Fernandes de; CORASSIN, Carlos Humberto. **Microbiologia, higiene e controle de qualidade no processamento de leites e derivados**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2019.

CUNHA, Patrícia. **Métodos de tipagem microbiológica para o rastreamento e controle de surtos**. Florianópolis: Neoprospecta, 2016. [dispositivo eletrônico]

DURAND, Loïc *et al.* Genotypic and phenotypic characterization of foodborne *Geobacillus stearothermophilus*. **Food Microbiology**, v. 45, p. 103-110, 2015.

FARRELL, John J. *et al.* Salvage microbiology: opportunities and challenges in the detection of bacterial pathogens following initiation of antimicrobial treatment. **Expert review of molecular diagnostics**, v. 15, n. 3, p. 349-360, 2015.

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

GOH, Kian Mau *et al.* Recent discoveries and applications of *Anoxybacillus*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 97, n. 4, p. 1475-1488, 2013.

GOMES, Marcos JP. **Gênero *Clostridium* spp.** Porto Alegre: FAVET-UFRGS, 2013.

GORSKI, Lisa; CSORDAS, Andrew. Molecular detection: Principles and methods. *In*: LIU, Dongyou (Ed.). **Molecular detection of foodborne pathogens**. Boca Raton, FL: CRC Press, 2009. p. 1-15.

GRADY, Elliot Nicholas *et al.* Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: a review. **Microbial cell factories**, v. 15, n. 1, p. 1-18, 2016.

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

GUPTA, Radhey S. *et al.* Robust demarcation of 17 distinct *Bacillus* species clades, proposed as novel Bacillaceae genera, by phylogenomics and comparative genomic analyses: description of *Robertmurraya kyonggiensis* sp. nov. and proposal for an emended genus *Bacillus* limiting it only to the members of the Subtilis and Cereus clades of

species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 11, p. 5753-5798, 2020.

HARWOOD, Colin R. (Ed.). **Bacillus**. Alemanha: Springer Science & Business Media, 1989.

HARWOOD, Colin R. *et al.* Secondary metabolite production and the safety of industrially important members of the *Bacillus subtilis* group. **FEMS microbiology reviews**, v. 42, n. 6, p. 721-738, 2018.

HEATHER, James M.; CHAIN, Benjamin. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. **Genomics**, v. 107, n. 1, p. 1-8, 2016.

HUSSEIN, Ali H.; LISOWSKA, Beata K.; LEAK, David J. The genus *Geobacillus* and their biotechnological potential. **Advances in applied microbiology**, v. 92, p. 1-48, 2015.

ISO-IDF. International Organization for Standardization. International Dairy Federation. **Dried milk**: Enumeration of the specially thermoresistant spores of thermophilic bacteria. Brussels; Geneva, 2009.

IWASE, C. H. T. **Bacillus cereus e Esporos de Bacilos Aeróbios Mesófilos e Termófilos Deteriorantes em Leite em Pó**. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2017.

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

JUNIOR, Jose Carlos Ribeiro. **Isolamento e identificação da microbiota esporulada e fúngica associada à deterioração do leite**. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2015.

LAW, Jodi Woan-Fei *et al.* Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations. **Frontiers in microbiology**, v. 5, p. 770, 2015.

LOESSNER, Martin J. *et al.* Long-chain polyphosphates inhibit growth of *Clostridium tyrobutyricum* in processed cheese spreads. **Journal of food protection**, v. 60, n. 5, p. 493-498, 1997.

LPSN. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclatura. **J. P. Euzéby**. [s.d.]. Disponível em: <https://www.bacterio.net/>. Acesso em: 28 jul. 2022.

LÜCKING, Genia *et al.* Characterization of aerobic spore-forming bacteria associated with industrial dairy processing environments and product spoilage. **International journal of food microbiology**, v. 166, n. 2, p. 270-279, 2013.

KARAMAN, Ayse Demet; ALVAREZ, Valente B. Microbiology of evaporated, condensed and powdered milk. **Dairy Microbiology and Biochemistry: Recent Developments**, v. 271, 2014.

- KENT, D. J. *et al.* Spore test parameters matter: Mesophilic and thermophilic spore counts detected in raw milk and dairy powders differ significantly by test method. **Journal of dairy science**, v. 99, n. 7, p. 5180-5191, 2016.
- KOBAYASHI, Hisami *et al.* *Clostridium pabulibutyricum* sp. nov., a butyric-acid-producing organism isolated from high-moisture grass silage. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 67, n. 12, p. 4974-4978, 2017.
- KOMORI, Kazuhiro *et al.* One year investigation of the prevalence and diversity of clostridial spores in raw milk from the Tokachi area of Hokkaido. **Animal Science Journal**, v. 90, n. 1, p. 135-139, 2019.
- MAIDEN, Martin CJ *et al.* MLST revisited: the gene-by-gene approach to bacterial genomics. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 10, p. 728-736, 2013.
- MAREZE, Juliana. **Identificação molecular de deteriorantes mesófilos em leite cru refrigerado**. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2017.
- MARIOTO, Louise Rodrigues Mariano *et al.* Potencial deteriorante da microbiota mesófila, psicrotrófica, termodúrica e esporulada do leite cru. **Ciência Animal Brasileira**, v. 21, 2020.
- MCKENNEY, Peter T.; DRIKS, Adam; EICHENBERGER, Patrick. The *Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of the multilayered coat. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 33-44, 2013.
- MEHTA, Dipakkumar. **The Influence of Spore-forming Microorganisms on the Quality and Functionality of Cultured Dairy Products**. South Dakota State University, 2018.
- MIKKOLA, R., ANDERSSON, M. A., GRIGORIEV, P., TEPLOVA, V. V., SARIS, N. E., RAINEY, F. A., SALKINOJA-SALONEN, M. S. *Bacillus amyloliquefaciens* strains isolated from moisture-damaged buildings produced surfactin and a substance toxic to mammalian cells. **Archives of Microbiology**, v. 181, p. 314-323, 2004.
- MOATSOU, Golfo; MOSCHOPOULOU, Ekaterini. Microbiology of raw milk. **Dairy Microbiology and Biochemistry**, p. 1-38, 2014.
- MOIR, Anne. Bacterial spore germination and protein mobility. **TRENDS in Microbiology**, v. 11, n. 10, p. 452-454, 2003.
- MURPHY, Patrick M.; LYNCH, David; KELLY, Philip M. Growth of thermophilic spore forming bacilli in milk during the manufacture of low heat powders. **International journal of dairy technology**, v. 52, n. 2, p. 45-50, 1999.
- NASSIB, T. A. *et al.* Prevalence of Spore-Forming Bacteria Associated with the Processing of Milk and Dairy Products Processing in Mansoura City. **Journal of Food and Dairy Sciences**, v. 9, n. 7, p. 257-261, 2018.
- PALOMINO-CAMARGO, Carolina; GONZÁLEZ-MUÑOZ, Yuniesky. Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos ver alimentos: ventajas y

limitaciones. **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública**, v. 31, p. 535-546, 2014.

PARAZZI, Clovis *et al.* Análises microbiológicas do açúcar mascavo. **Bioscience Journal**, v. 25, n. 3, p. 32-40, 2009.

PEREIRA, Ana Paula Maciel; SANT'ANA, Anderson S. Diversity and fate of spore forming bacteria in cocoa powder, milk powder, starch and sugar during processing: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 76, p. 101-118, 2018.

PIGGOT, Patrick J.; HILBERT, David W. Sporulation of *Bacillus subtilis*. **Current opinion in microbiology**, v. 7, n. 6, p. 579-586, 2004.

PUTRI, Tuflikha Primi. **Understanding thermophilic spore-forming bacteria in milk powders**. Tese (Doutorado). University of Tasmania. Australia, 2017.

RAASKA, Laura *et al.* Potential microbiological hazards in the production of refined paper products for food applications. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 225-231, 2002.

RECIO, Isidra *et al.* Characterization of peptides produced by the action of psychrotrophic proteinases on  $\kappa$ -casein. **Journal of Dairy Research**, v. 67, n. 4, p. 625-630, 2000.

REYES, Alessandra Frias *et al.* **Avaliação da contaminação por micro-organismos esporulados e indicadores em requeijão cremoso**. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2008.

ROBINSON, Richard K. **Encyclopedia of food microbiology**. 2. ed. Cambridge: Academic Press, 2014.

RONIMUS, Ron S. *et al.* A RAPD-based comparison of thermophilic bacilli from milk powders. **International journal of food microbiology**, v. 85, n. 1-2, p. 45-61, 2003.

RUCKERT, Andreas; RONIMUS, Ron S.; MORGAN, Hugh W. A RAPD-based survey of thermophilic bacilli in milk powders from different countries. **International journal of food microbiology**, v. 96, n. 3, p. 263-272, 2004.

SADIQ, Faizan A. *et al.* The heat resistance and spoilage potential of aerobic mesophilic and thermophilic spore forming bacteria isolated from Chinese milk powders. **International journal of food microbiology**, v. 238, p. 193-201, 2016.

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

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SANTANA, E. H. W. *et al.* Milk contamination indifferent points of the dairy process. Mesophilic, psychrotrophic and proteolytic. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 25, n. 4, p. 349-358, 2004.

SCHELDEMAN, Patsy *et al.* Incidence and diversity of potentially highly heat-resistant spores isolated at dairy farms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 3, p. 1480-1494, 2005.

SCHMIDT, V. S. J.; KAUFMANN, V.; KULOZIK, U.; SCHERER, S.; WENNING, M. Microbial biodiversity, quality and shelf life of microfiltered and pasteurized Extended Shelf Life (ESL) milk from Germany, Austria and Switzerland. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 154, n. 1-2, p. 1-9, 2012.

SCOTT, Sara A. *et al.* The formation of thermophilic spores during the manufacture of whole milk powder. **International journal of dairy technology**, v. 60, n. 2, p. 109-117, 2007.

SETLOW, Peter. Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. **Journal of applied microbiology**, v. 101, n. 3, p. 514-525, 2006.

SETLOW, Peter. Spore germination. **Current opinion in microbiology**, v. 6, n. 6, p. 550-556, 2003.

SILVA, Neusely *et al.* **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. São Paulo: Blucher, 2017.

SORIANO, S.; SORIANO, A. Nueva bacteria anaerobia productora de una alteracion en sordinas envasadas. **Rev. Asoc. Argent. Dietol**, v. 6, p. 36-41, 1948.

STACKEBRANDT, EaBMG; GOEBEL, Brett M. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 44, n. 4, p. 846-849, 1994.

STRADIOTTO, Grazielle Cristina. **Micro-organismos esporulados na cadeia produtiva da gelatina**: concentração, caracterização e impacto na formulação de alimentos. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2019.

STUMBO, C. R. Factors influencing thermal resistance of bacteria. **Thermobacteriology in food processing**, v. 2, p. 112-118, 1973.

SUOMINEN, I., ANDERSSON, M. A., ANDERSSON, M. C., HALLAKSELA, A. M., KAMPFER, P., RAINEY, F. A., SALKINOJA-SALONEN, M. Toxic *Bacillus pumilus* from indoor air, recycled paper pulp, Norway spruce, food poisoning outbreaks and clinical samples. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 24, p. 267-276, 2001.

TEH, Koon Hoong *et al.* Biofilm: An unrecognised source of spoilage enzymes in dairy products?. **International dairy journal**, v. 34, n. 1, p. 32-40, 2014.

- TETRA PAK. Diry. **Milk Powder**. [s.d.]. Disponível em: <http://www.tetrapak.com/br/findbyfood/dairy/milk-powder>. Acesso em: 22 ago. 2021.
- VERDURMEN, R. E. M. *et al.* Optimising product quality and process control for powdered dairy products. **Dairy processing: Improving quality**, p. 333-365, 2003.
- VIDAL, Ana Maria Centola; NETTO, A. S. (Org.). **Obtenção e processamento do leite e derivados**. Pirassununga: Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, 2018.
- VIDAL-MARTINS, A. M. C.; ROSSI JR, O. D.; REZENDE-LAGO, N. C. Microrganismos heterotróficos mesófilos e bactérias do grupo do *Bacillus cereus* em leite integral submetido a ultra alta temperatura. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 3, p. 396-400, 2005.
- WAGNER, Isaac D.; WIEGEL, Juergen. Diversity of thermophilic anaerobes. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1125, n. 1, p. 1-43, 2008.
- WANG, A.; ASH, G. J. Whole genome phylogeny of *Bacillus* by feature frequency profiles (FFP). **Scientific reports**, v. 5, n. 1, 1-14, 2015.
- WATTERSON, M. J. *et al.* Evaluation of dairy powder products implicates thermophilic sporeformers as the primary organisms of interest. **Journal of dairy science**, v. 97, n. 4, p. 2487-2497, 2014.
- WILDE, E.; COLLINS, M. D.; HIPPE, H. *Clostridium pascui* sp. nov., a new glutamate-fermenting sporeformer from a pasture in Pakistan. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 164-170, 1997.
- WITTHUHN, Marina *et al.* Thermal resistance of aerobic spore formers isolated from food products. **International journal of dairy technology**, v. 64, n. 4, p. 486-493, 2011.
- YUAN, Dong-Dong *et al.* A survey on occurrence of thermophilic bacilli in commercial milk powders in China. **Food Control**, v. 25, n. 2, p. 752-757, 2012.
- YOON, Ki-Hong. Draft genome sequence of *Weizmannia coagulans* BA375 isolated from saltern soil in Korea. **Korean Journal of Microbiology**, v. 57, n. 2, p. 119-121, 2021.
- ZHANG, Hongfa; YOU, Chunping. A universal PCR method and its application in sequence-based identification of microorganisms in dairy. **International Dairy Journal**, v. 85, p. 41-48, 2018.
- ZHAO, Yu *et al.* Abiotic and microbiotic factors controlling biofilm formation by thermophilic sporeformers. **Applied and environmental microbiology**, v. 79, n. 18, p. 5652-5660, 2013.

**APÊNDICE A - RESULTADOS DAS CONTAGENS DE ESPOROS REALIZADAS NAS AMOSTRAS DE LEITE EM PÓ**

<b>Código das amostras</b>	<b>Mesófilos aeróbios (log10 UFC/g)</b>	<b>Mesófilos anaeróbios (log10 UFC/g)</b>	<b>Termófilos aeróbios (log10 UFC/g)</b>	<b>Termófilos anaeróbios (log10 UFC/g)</b>
LP1	1,1 x 10 <sup>2</sup>	2,0 x 10 <sup>1</sup>	2,8 x 10 <sup>1</sup>	3,0 x 10 <sup>0</sup>
LP2	1,3 x 10 <sup>2</sup>	9,0 x 10 <sup>1</sup>	1,7 x 10 <sup>3</sup>	6,0 x 10 <sup>0</sup>
LP3	1,1 x 10 <sup>2</sup>	2,0 x 10 <sup>1</sup>	1,6 x 10 <sup>4</sup>	1,4 x 10 <sup>3</sup>
LP4	6,0 x 10 <sup>0</sup>	2,0 x 10 <sup>0</sup>	3,0 x 10 <sup>1</sup>	6,0 x 10 <sup>0</sup>
LP5	8,0 x 10 <sup>1</sup>	2,0 x 10 <sup>1</sup>	3,6 x 10 <sup>4</sup>	3,5 x 10 <sup>3</sup>
LP6	3,1 x 10 <sup>2</sup>	1,9 x 10 <sup>2</sup>	1,2 x 10 <sup>3</sup>	9,0 x 10 <sup>2</sup>
LP7	1,5 x 10 <sup>2</sup>	2,2 x 10 <sup>1</sup>	3,5 x 10 <sup>4</sup>	2,0 x 10 <sup>0</sup>
LP8	3,6 x 10 <sup>2</sup>	1,7 x 10 <sup>2</sup>	1,1 x 10 <sup>4</sup>	5,8 x 10 <sup>3</sup>
LP9	1,4 x 10 <sup>2</sup>	5,0 x 10 <sup>0</sup>	1,7 x 10 <sup>4</sup>	8,9 x 10 <sup>3</sup>
LP10	1,4 x 10 <sup>2</sup>	1,2 x 10 <sup>1</sup>	5,0 x 10 <sup>3</sup>	5,0 x 10 <sup>2</sup>
LP11	5,2 x 10 <sup>2</sup>	1,8 x 10 <sup>1</sup>	2,0 x 10 <sup>1</sup>	2,2 x 10 <sup>1</sup>
LP12	2,3 x 10 <sup>2</sup>	5,5 x 10 <sup>1</sup>	1,5 x 10 <sup>2</sup>	9,0 x 10 <sup>0</sup>
LP13	2,1 x 10 <sup>2</sup>	9,8 x 10 <sup>1</sup>	1,8 x 10 <sup>2</sup>	7,0 x 10 <sup>2</sup>
LP14	6,6 x 10 <sup>2</sup>	2,8 x 10 <sup>2</sup>	1,6 x 10 <sup>2</sup>	2,6 x 10 <sup>2</sup>

## APÊNDICE B - DESCRIÇÃO DOS ESPORULADOS ISOLADOS EM LEITE EM PÓ

AMOSTRA	MARCA	CÓDIGO DO ISOLADO	RESULTADO
1	D	9TA	<i>Weizmannia coagulans</i>
2	E	11TA	<i>Weizmannia coagulans</i>
3	E	12TA1	<i>Weizmannia coagulans</i>
4	F	13TA1	<i>Weizmannia coagulans</i>
5	C	14MA1	<i>Bacillus</i> sp.
6	B	5MA	NI
7	C	6MAg	<i>Clostridium</i> sp.
8	A	2TA1	<i>Weizmannia coagulans</i>
9	D	7M2	<i>Bacillus licheniformis</i>
10	C	8M1	<i>Bacillus</i> sp.
11	D	9M	<i>Bacillus</i> sp.
12	B	10M	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
13	E	11M1	<i>Bacillus</i> sp
14	E	11M2	<i>Bacillus</i> sp
15	E	12M1	<i>Bacillus</i> sp
16	F	13M2	<i>Bacillus</i> sp
17	C	14M2	<i>Bacillus</i> sp
18	A	2T	<i>Bacillus</i> sp

19	B	3T2	<i>Geobacillus</i> sp.
20	B	4T	<i>Geobacillus</i> sp.
21	B	5T	<i>Geobacillus</i> sp.
22	C	6T	<i>Geobacillus</i> sp.
23	D	7T2	<i>Anoxybacillus flavithermus</i>
24	C	8T	<i>Anoxybacillus flavithermus</i>
25	B	10T2	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
26	E	12T1	<i>Bacillus</i> sp.
27	E	12T2	<i>Geobacillus</i> sp.
28	F	13T2	<i>Weizmannia coagulans</i>
29	C	14T	<i>Geobacillus</i> sp.
30	A	1MA1	<i>Bacillus</i> sp.
31	B	3MA	<i>Bacillus</i> sp.
32	B	4MA	<i>Weizmannia coagulans</i>
33	C	6MA≠	<i>Clostridium</i> sp.
34	C	6TA1	<i>Weizmannia coagulans</i>
35	D	7MA2	<i>Clostridium pabulibutyricum</i>
36	C	8MA1	<i>Clostridium sporosphaeroides</i>
37	D	9MA1	<i>Bacillus</i> sp.
38	A	1M	NI

39	A	2M	NI
40	B	3M	NI
41	B	4M	NI
42	B	5M	NI
43	C	6M	NI
44	B	10MA	NI
45	E	11MA1	<i>Clostridium butyricum</i>
46	E	12MA2	NI
47	F	13MA2	<i>Clostridium butyricum</i>

---

NI = não identificado

**APÊNDICE C - RESULTADOS DAS CONTAGENS DE ESPOROS REALIZADAS NAS AMOSTRAS DE LEITE EM PÓ REFERÊNCIA**

<b>Código das amostras</b>	<b>Mesófilos aeróbios (log10 UFC/g)</b>	<b>Mesófilos anaeróbios (log10 UFC/g)</b>	<b>Termófilos aeróbios (log10 UFC/g)</b>	<b>Termófilos anaeróbios (log10 UFC/g)</b>
Valor de referência*	21.000 a 25.000	12.000 a 14.000	800 a 1.400	900 a 2100
1	2,1 x 10 <sup>4</sup>	9,8 x 10 <sup>3</sup>	6,3 x 10 <sup>2</sup>	1,2 x 10 <sup>3</sup>
2	1,8 x 10 <sup>4</sup>	7,9 x 10 <sup>3</sup>	1,7 x 10 <sup>3</sup>	1,8 x 10 <sup>3</sup>
3	1,9 x 10 <sup>4</sup>	8,3 x 10 <sup>3</sup>	2,1 x 10 <sup>3</sup>	2,1 x 10 <sup>3</sup>
4	1,6 x 10 <sup>4</sup>	9,4 x 10 <sup>3</sup>	1,5 x 10 <sup>3</sup>	1,1 x 10 <sup>3</sup>
5	1,7 x 10 <sup>4</sup>	1,1 x 10 <sup>4</sup>	9,8 x 10 <sup>2</sup>	1,7 x 10 <sup>3</sup>
6	2,0 x 10 <sup>4</sup>	1,0 x 10 <sup>4</sup>	1,2 x 10 <sup>3</sup>	2,2 x 10 <sup>3</sup>
7	1,8 x 10 <sup>4</sup>	9,8 x 10 <sup>3</sup>	9,6 x 10 <sup>2</sup>	1,5 x 10 <sup>3</sup>
8	1,6 x 10 <sup>4</sup>	1,0 x 10 <sup>4</sup>	1,0 x 10 <sup>3</sup>	1,3 x 10 <sup>3</sup>
9	1,9 x 10 <sup>4</sup>	9,9 x 10 <sup>3</sup>	1,3 x 10 <sup>3</sup>	2,0 x 10 <sup>3</sup>
10	1,7 x 10 <sup>4</sup>	9,3 x 10 <sup>3</sup>	8,8 x 10 <sup>2</sup>	1,6 x 10 <sup>3</sup>
<b>Média</b>	<b>1,8 x 10<sup>4</sup></b>	<b>9,5 x 10<sup>3</sup></b>	<b>1,2 x 10<sup>3</sup></b>	<b>1,7 x 10<sup>3</sup></b>

\*Valor enviado pelo fornecedor (IFM Quality).

## APÊNDICE D – ARTIGO A SER PUBLICADO

### QUANTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE ESPORULADOS BACTERIANOS ISOLADOS DE LEITE EM PÓ PRODUZIDO NO RIO GRANDE DO SUL/BRASIL<sup>1</sup>

Marion Ruis<sup>1</sup>

Hans Fröder<sup>2</sup>

Alfonso David Rodríguez Lázaro<sup>3</sup>

Karla Joseane Perez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, Encantado/RS, Brasil

<sup>2</sup>Universidade do Vale do Taquari, Unianálises, Lajeado/RS, Brasil

<sup>3</sup>Universidade de Burgos, Burgos, Espanha

#### RESUMO

O tratamento térmico utilizado no processamento do leite em pó nem sempre é capaz de inativar os micro-organismos formadores de esporos. A deterioração e a produção de toxinas por algumas espécies é uma preocupação significativa para a indústria de laticínios. A identificação desses micro-organismos é fundamental para resolução de problemas com a qualidade nesses produtos. O objetivo deste estudo foi quantificar e identificar as espécies predominantes no leite em pó, visando conhecer a variedade genética dos isolados. Quatorze amostras foram analisadas, totalizando cinquenta e duas análises. Verificaram-se contagens de esporos em todas as amostras analisadas, sendo os esporos termófilos com maior nível de contaminação. Usando o seqüenciamento 16S rRNA 47 isolados foram identificados como *Weizmannia coagulans* (21%), *Anoxybacillus flavithermus* (5,3%), *Clostridium butyricum* (5,3%), *Bacillus amyloliquefaciens* (2,6%), *Geobacillus stearothermophilus* (2,6%), *Clostridium pabulibutyricum* (2,6%), *Clostridium sporosphaeroides* (2,6%), *Bacillus licheniformis* (2,6%), *Bacillus* sp. (34%), *Geobacillus* sp. (15,8%) e *Clostridium* sp. (5,3%).

#### INTRODUÇÃO

O leite em pó começou a ser produzido com o objetivo de aumentar a vida de prateleira, diminuir os custos com transporte e estocagem e oferecer um produto com maior concentração de sólidos do leite, servindo como ingrediente às indústrias produtoras de sorvetes, produtos de confeitaria, fórmulas infantis, entre outros alimentos (Cruz, Zacarchenco, Oliveira, & Corassin, 2019).

---

<sup>1</sup> Artigo a ser submetido após considerações da banca.

A qualidade microbiológica do leite em pó está relacionada à estabilidade da matéria-prima e as condições de processamento. Assim que é retirado do úbere de animais saudáveis, o leite cru apresenta baixa contaminação por micro-organismos, geralmente a contagem total é de  $<10^3 \log_{10}$  UFC/mL. Porém, após a ordenha, está sujeito à contaminação por bactérias e esporos oriundos do sistema produtivo. Se as condições de higiene forem negligenciadas, a carga microbiana pode chegar a  $10^6 \log_{10}$  UFC/mL (Moatsou & Moschopoulou, 2014). Conforme a Instrução Normativa n. 76 de 26 de novembro de 2018, o leite cru deve apresentar médias geométricas trimestrais de contagem padrão em placas de, no máximo,  $3,0 \times 10^5 \log_{10}$  UFC/mL.

Bactérias formadoras de esporos são contaminantes importantes na indústria de laticínios podendo afetar significativamente a qualidade e a segurança dos produtos lácteos, reduzindo a vida útil durante o armazenamento. No entanto, o controle efetivo dessas bactérias ainda é uma tarefa difícil devido à alta resistência dos esporos e da capacidade de algumas espécies formarem biofilmes nas linhas de processamento (Burgess, Brooks, Rakonjac, Walker & Flint, 2009; Marchand et al., 2012).

Burgess, Lindsay & Flint (2014) estudaram 10 cepas de *G. stearothermophilus* e uma espécie de *Anoxybacillus* isoladas de uma fábrica de leite em pó e concluíram que as cepas apresentavam capacidade de produzir esporos a partir de biofilmes. Outro estudo mostrou que esporos de *A. flavithermus* e *Geobacillus* foram detectados ( $>1 \log_{10}$  UFC/g) no leite em pó após 9 h de processamento e atingiram níveis de até  $10^4 \log_{10}$  UFC/g no evaporador após 18 h (Scott et al., 2007).

Os esporos suportam condições de estresse ambiental como exposição a altas temperaturas, congelamento, desidratação, irradiação, conservantes e desinfetantes. Uma vez formados, permanecem em estado de dormência, e em condições favoráveis germinam e dão origem a células vegetativas com todas as atividades metabólicas (Buehner, Anand & Garcia, 2014; Setlow & Johnson, 2019). Segundo Setlow (2003), os ácidos liberados durante a germinação de um esporo podem estimular a germinação dos demais esporos localizados no mesmo ambiente.

Em estudos já realizados, os principais micro-organismos esporulados isolados de produtos lácteos desidratados, como o leite em pó, foram *Anoxybacillus flavithermus*, *Geobacillus* sp., *Paenibacillus* sp., assim como os gêneros *Bacillus* e *Clostridium* onde há espécies patogênicas e produtoras de toxinas. Dentre os deteriorantes pode-se citar o *G. stearothermophilus* e *Bacillus sporothermodurans*, que embora não apresentem risco à saúde do consumidor, são indicadores de condições insatisfatórias de higiene e boas práticas de

fabricação (Karaman & Alvarez, 2014; Scott et al., 2007). No entanto, são necessários mais estudos para maior caracterização e conhecimento das espécies presentes.

Algumas espécies de esporulados são produtoras de enzimas como proteases e lipases, influenciando a qualidade dos produtos lácteos por modificar aroma, textura e sabor (Cogan, 1977; Reyes, 2008; Woods, Burger, Beven, & Beacham, 2001). As lipases termorresistentes podem hidrolisar a gordura nos produtos os quais o leite em pó é adicionado como ingredientes (Mehta, 2018).

Em um estudo realizado por Mareze (2017) foi identificado à espécie *B. licheniformis* em leite cru refrigerado onde 63% das cepas isoladas apresentaram atividade proteolítica e lipolítica. Ribeiro (2015) constatou que as contagens de esporos aeróbios nas amostras de leite que analisou foram relativamente baixas, porém 30% das espécies isoladas apresentaram atividade proteolítica e/ou lipolítica.

No Brasil, não há legislação que contemple a quantificação de esporos bacterianos no leite em pó, devendo a empresa estabelecer o seu limite. Nos Estados Unidos da América (EUA), o Conselho de Exportação de Laticínios (Council) implementa limites de esporos aeróbios termófilos em  $<5 \times 10^2 \log_{10}$  UFC/g e em  $<10^3 \log_{10}$  UFC/g para esporos aeróbios mesófilos em leite em pó destinado a clientes internacionais. Na Irlanda, a *Food Safety Authority of Ireland* (FSAI) afirma que a contagem de esporos aeróbios em produtos lácteos em pó deve ser, idealmente, de  $<10^4 \log_{10}$  UFC/g. A China, por sua vez, estabeleceu o limite de  $10^3 \log_{10}$  UFC/g para esporos aeróbios em fórmulas lácteas em pó para lactentes (Watterson, Kent, Boor, Wiedmann & Martin, 2014; Yuan et al., 2012).

A caracterização do micro-organismo ao nível de espécie é de grande importância para a indústria de alimentos que necessita de monitoramento constante. Nos últimos anos, diversas técnicas moleculares surgiram oferecendo rapidez na detecção juntamente com a especificidade e sensibilidade (Gorski & Csordas, 2009). Li et al. (2019) analisaram 22 amostras de leite em pó na Irlanda utilizando o método de seqüenciamento pelo 16S rRNA, dos 269 isolados, 68% foram identificados como *B. licheniformis*, 16% eram outras espécies de *Bacillus*, em menor quantidade foram identificados outros gêneros incluindo *Clostridium*, *Geobacillus* e *Anoxybacillus*.

Considerando as problemáticas dos esporulados no leite em pó, o objetivo deste estudo foi quantificar e identificar as espécies predominantes, visando conhecer a variedade genética dos isolados através do sequenciamento do gene 16S rRNA.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 AMOSTRAS

Quatorze amostras de leite em pó integral, no início do prazo de validade, de seis diferentes marcas comerciais produzidas no Rio Grande do Sul/Brasil foram analisadas entre setembro de 2020 e setembro de 2021, quanto à presença de esporos bacterianos aeróbios e anaeróbios, mesófilos e termófilos.

### 2.2 PREPARO DAS AMOSTRAS

Alíquotas de 10 g foram pesadas assepticamente e transferidas para saco de stomacher estéreis e, em seguida, 90 mL de água destilada ou solução hidróxido de sódio 0,02 N, para os esporos aeróbios termófilos, foram adicionadas, sendo esta considerada a diluição  $10^{-1}$ . Essa diluição inicial foi transferida para um frasco Schott de 250 mL e submetida ao tratamento térmico adequado para cada tipo de esporo.

### 2.3 ANÁLISE DE ESPOROS BACTERIANOS

#### 2.3.1 Mesófilo aeróbio

A diluição inicial foi submetida a tratamento térmico em banho-maria a  $80,0 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$  por 12 minutos, com posterior resfriamento em banho de gelo. Diluições decimais seriadas até a  $10^{-3}$  foram realizadas; para obter a diluição  $10^0$  2mL da diluição inicial, foram semeadas em 5 placas de Petri e, em seguida, ágar padrão para contagem (PCA) (Oxoid) suplementado com 0,1% de amido solúvel (Synth) foi adicionado, sendo as placas incubadas a  $35^{\circ}\text{C}$  por 48h. (Apha, 2004).

#### 2.3.2 Termófilo aeróbio

A diluição inicial foi submetida a tratamento térmico em autoclave a  $108,4 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos, com posterior resfriamento em banho de gelo. Diluições decimais seriadas até a  $10^{-3}$  foram realizadas; para obter a diluição  $10^0$  2mL da diluição inicial, foram semeadas em 5

placas de Petri e, em seguida, ágar dextrose triptona (DTA) (Oxoid) foi adicionado, sendo as placas incubadas a  $55^{\circ}\text{C} \pm 1,0^{\circ}\text{C}$  por  $48 \pm 3$  h (APHA, 2015b).

### **2.3.3 Mesófilo anaeróbio**

Análise com modificações metodológicas para realização de contagem em placas. A diluição inicial foi submetida a tratamento térmico em banho-maria a  $80,0 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos, com posterior resfriamento em banho de gelo. Diluições decimais seriadas até a  $10^{-3}$  foram realizadas; para obter a diluição  $10^0$  2mL da diluição inicial, foram semeadas em 5 placas de Petri e, em seguida, ágar clostridial reforçado (RCA) (Oxoid) foi adicionado, sendo as placas incubadas com gerador de anaerobiose (Biomérieux) em jarra a  $35^{\circ}\text{C}$  por 120h (Apha, 2015a).

### **2.3.4 Termófilo anaeróbio**

Análise com modificações metodológicas para realização de contagem em placas. A diluição inicial foi submetida a tratamento térmico em banho-maria até a fervura quando iniciou-se a contagem de 5 minutos, com posterior resfriamento em banho de gelo. Diluições decimais seriadas até a  $10^{-3}$  foram realizadas; para obter a diluição  $10^0$  2mL da diluição inicial, foram semeadas em 5 placas de Petri e, em seguida, ágar clostridial reforçado (RCA) (Oxoid) foi adicionado sendo as placas incubadas com gerador de anaerobiose (Biomérieux) em jarra a  $55^{\circ}\text{C}$  por 72 h (Apha, 2015c).

## **2.4 GARANTIA DA QUALIDADE DOS ENSAIOS**

Foi utilizado como padrão o material de referência (MR) Spore Reference (RM4290) da IFM Quality Services Pty Ltd (Ingleburn, Austrália), que consiste em alíquotas de leite em pó contaminadas com esporos bacterianos, em paralelo as 10 primeiras amostras analisadas. Para verificar se houve diferença significativa entre o valor de referência fornecido pelo provedor e o valor obtido nas amostras padrão de leite em pó analisadas, utilizou-se ANOVA com 95% de confiança, através do Excel v. 12.0.

## 2.5 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DAS COLÔNIAS

Três colônias de morfologia variável, sempre que possível, foram selecionadas por inspeção visual. Para purificação os aeróbios foram repicados para nutriente inclinado e após crescimento transferidos para criotubos de 2 mL contendo caldo infusão cérebro coração (BHI) (Oxoid). Os anaeróbios foram repicados para criotubos de 2 mL com meio reforçado para clostridium (RCM) (Oxoid) adicionando uma gota de óleo mineral estéril (Laborclin) para gerar anaerobiose. As condições de incubação foram as mesmas da etapa inicial para cada tipo de esporulado. Nos tubos que apresentaram crescimento foram adicionados 0,3 mL de glicerol (Synth) e armazenados em freezer a  $\leq -18$  °C.

## 2.6 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO DNA

Os isolados foram ativados em placas de ágar nutriente. Após crescimento nas placas, foi realizada a etapa de extração e purificação do DNA com o kit comercial DPK-116S - Bacteria DNA preparation kit columns-based spin column based genomic DNA purification from bacteria, da marca Cellco Biotec do Brasil Ltda (São Paulo, Brasil), de acordo com instruções do fabricante.

## 2.7 AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DO GENE 16S rRNA

Para a realização da PCR utilizou-se o kit MasterMix da Ludwig Biotecnologia. O conjunto de primers utilizados foram 27F/1492R (27F - GAGTTTGATCATGGCTCAG, 1492R – GGTTACCTTGTTACGACTT). As reações contendo 1,5  $\mu$ L de DNA, 1,25  $\mu$ L de cada primer, 12,5  $\mu$ L do MasterMix, completados com 8,5  $\mu$ L de água livre de DNases foram levadas ao termociclador (QuantStudio 5, ThermoFisher Scientific) com as seguintes condições: 94 °C por cinco minutos, seguido por 30 ciclos a 94 °C por 30 s., 55 °C por 30 s., 72 °C por um minuto e, por fim, 72 °C por cinco minutos, conforme descrito por Zhang & You (2018). Os produtos da PCR foram purificados e sequenciados pelo método de Sanger, Nicklen & Coulson (1977). A qualidade das sequências foi analisada pelos programas Bioedit e Chromas, a busca no banco de dados genético foi realizada usando o BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Somente isolados onde as sequências de 16S rRNA apresentaram similaridades  $\geq 97\%$  com as sequências das bases de dados, foram consideradas pertencentes a uma determinada espécie (Stackebrandt & Goebel, 1999).

## 2.8 ANÁLISE FILOGENÉTICA

A sequência de DNA correspondente à subunidade ribossomal 16S do organismo *Aquifex aeolicus* da linhagem VF5, uma bactéria Gram-negativa e hipertermofílica, foi obtida no banco de dados NCBI (número de acesso NR\_075056.2) para utilização como outgroup nas análises filogenéticas. A sequência do outgroup em conjunto com as sequências de todas as amostras foram alinhadas com o algoritmo ClustalW disponível no software MEGA v.11, sendo mantidos os parâmetros padrão da ferramenta. A árvore foi construída a partir do método de Neighbor-joining. Para a análise utilizou-se o modelo evolutivo de substituição nucleotídica de Kimura-2-parâmetros. A confiabilidade dos nós foi avaliada através de 1000 replicações de bootstrap.

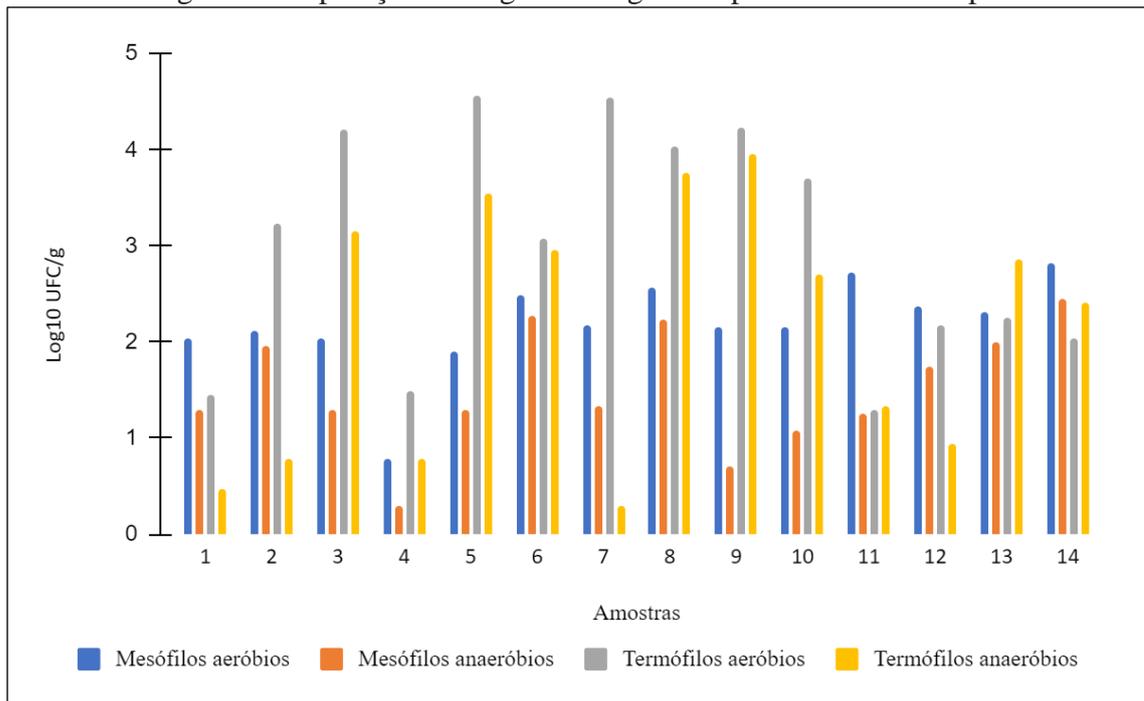
## 3 RESULTADOS

### 3.1 QUANTIFICAÇÃO DE ESPOROS

Na Tabela 1 encontram-se os resultados quantitativos dos esporos encontrados no leite em pó. A Figura 1 apresenta o nível de contaminação nas 14 amostras analisadas.

Tabela 1 - População (log<sub>10</sub> UFC/g) dos diferentes esporulados bacterianos

Esporos	Mínimo	Máximo
Mesófilos aeróbios	0,78	2,82
Mesófilos anaeróbios	0,30	2,45
Termófilos aeróbios totais	1,30	4,56
Termófilos anaeróbios	0,30	3,95

Figura 1 - População em log<sub>10</sub> UFC/g dos esporos em leite em pó

### 3.2 QUANTIFICAÇÃO MR

Para garantir a qualidade da análise na recuperação dos esporos presentes nas amostras de leite em pó, foi utilizado o MR Spore Reference, que foi submetido ao mesmo procedimento analítico das amostras, e comparado o valor obtido com o valor fornecido pelo provedor para cada tipo de esporo. Os valores médios das populações encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2 - Valores médios do MR e valores médios obtidos para 10 alíquotas de MR submetidas ao mesmo procedimento analítico das amostras de leite em pó para cada tipo de esporo

Tipo de esporo	Valores médios da referência (log <sub>10</sub> UFC/g)*	Valores médios obtidos (log <sub>10</sub> UFC/g)
Mesófilos aeróbios	4,36	4,26
Mesófilos anaeróbios	3,11	3,98
Termófilos aeróbios totais	3,04	3,08
Termófilos anaeróbios	3,18	3,23

\*Valores fornecidos pelo provedor

Para comparar se houve diferença entre as contagens da referência e as contagens obtidas após o procedimento analítico para cada tipo de esporo, procedeu-se com o teste ANOVA, com nível de significância de 95%, para um único fator. O valor F (6.468828) foi

menor que o F-crítico (6.591382), isso revela que não houve diferença significativa entre as contagens.

### 3.3 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS

Foram obtidos 47 isolados de bactérias formadoras de esporos para o sequenciamento do 16S rRNA. Esse permitiu identificar 17 (36,17%) espécies dos 47 isolados. Outras 21 (44,68%) cepas tiveram sua identificação em nível de gênero, e 9 (19,15%) apresentaram baixa qualidade no eletroferograma, sendo que estas sequências não foram utilizadas na identificação.

Tabela 3 - Identificação por sequenciamento do gene 16S rRNA das bactérias formadoras de esporos

Identificação	Similaridade de nucleotídeos (%)*	(n)	(%)
<i>Weizmannia coagulans</i>	98,38 a 100	8	21
<i>A. flavithermus</i>	100	2	5,3
<i>C. butyricum</i>	99,2 e 99,73	2	5,3
<i>B. amyloliquefaciens</i>	99,30	1	2,6
<i>G. stearothermophilus</i>	100	1	2,6
<i>C. pabulibutyricum</i>	100	1	2,6
<i>C. sporosphaeroides</i>	100	1	2,6
<i>Bacillus licheniformis</i>	100	1	2,6
<i>Bacillus</i> sp.	97,14 a 100	13	34,2
<i>Geobacillus</i> sp.	97,85 a 100	6	15,8
<i>Clostridium</i> sp.	100	2	5,3

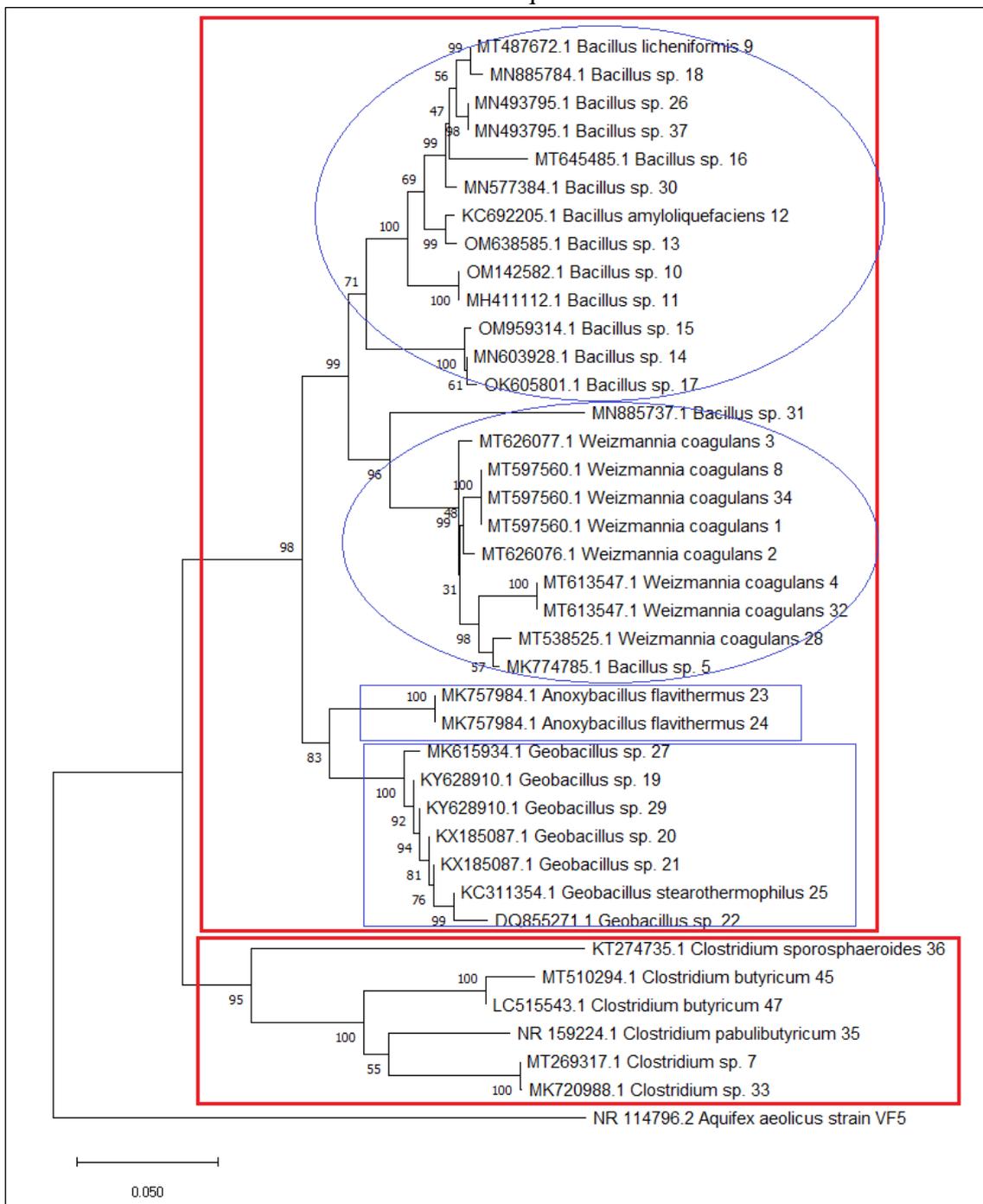
\* Percentual de identidade baseada no alinhamento das sequências obtidas com as depositadas no GenBank utilizando a ferramenta BLAST.

### 3.4 ÁRVORE FILOGENÉTICA

Com base na árvore filogenética gerada pelo software, observa-se partindo do nó (ponto de ramificação) do ancestral comum, que houve uma bifurcação em dois novos nós, sendo o primeiro, um agrupamento envolvendo os gêneros *Bacillus*, *Weizmannia*, *Anoxybacillus*, *Geobacillus*, e o segundo, compreendendo a família Clostridiaceae. Verifica-se que no primeiro agrupamento da família Bacillaceae houve uma nova bifurcação, separando os gêneros *Bacillus*

de *Weizmannia*. Como no sequenciamento muitos isolados foram identificados apenas em nível de gênero é provável que alguns dos isolados agrupados com *B. licheniformis* e *B. amyloliquefaciens* também pertençam ao grupo *B. subtilis* por serem estreitamente relacionadas com as espécies identificadas. As demais espécies pertencentes ao grupo são: *B. subtilis*, *B. atrophaeus*, *B. mojavenensis*, *B. sonorensis*, *B. vallismortis*, *B. pumilus*, *B. tequilensis* e *B. velezensis* (Harwood, Mouillon, Pohl & Arnau, 2018). As amostras 31 e 5 se mostraram estreitamente relacionadas com a espécie *W. coagulans*, provavelmente pelo fato de *W. coagulans* anteriormente ser classificada no gênero *Bacillus*, com o qual apresenta similaridade (Gupta et al.,2020). No outro nó da bifurcação, houve a separação da espécie *A. flavithermus* do gênero *Geobacillus*, sendo ambos termófilos.

Fig. 2 Árvore filogenética obtida a partir de seqüências 16S ribossômicas com o método de *Neighbor-joining*. Os valores nos galhos representam o suporte do bootstrap para a divisão subsequente



#### 4 DISCUSSÃO

Este estudo mostra que níveis populacionais de esporos foram obtidos em todas as amostras analisadas, indicando que a contaminação é frequente por bactérias formadoras de esporos, porém, são os termófilos que apresentam os maiores índices de contaminação (Tab. e

Fig. 1). Comparando os valores obtidos para esporos termófilos aeróbios nas amostras de leite em pó com os limites estabelecidos internacionalmente, verificou-se que 8 das 14 amostras analisadas apresentaram resultados acima dos padrões internacionais, conforme Tabela 4.

Tabela 4 – Resultado da contagem de esporos termófilos aeróbios para 8 amostras de leite em pó em comparação com os limites de tolerância estabelecidos internacionalmente

Amostra	Contagem	Council (EUA)	FSAI (Irlanda)	China
LP2	$1,7 \times 10^3^*$			
LP3	$1,6 \times 10^4$			
LP5	$3,6 \times 10^4$			
LP6	$1,2 \times 10^3^*$	$<5 \times 10^2$	$<10^4$	$10^3$
LP7	$3,5 \times 10^4$			
LP8	$1,1 \times 10^4$			
LP9	$1,7 \times 10^4$			
LP10	$5,0 \times 10^3^*$			

\*Somente para Council e China

Fonte: Autora (2022); Watterson et al., 2014; Yuan et al., 2012

Considerando que a maioria das amostras apresentou resultado insatisfatório para esporos termófilos aeróbios segundo os padrões internacionais, esse estudo indica que há a necessidade de direcionamento específico para um maior controle de esporos termófilos nas plantas de processamento. Devido à alta resistência ao calor desse tipo de esporo, é preciso maior compreensão da proliferação, da sobrevivência e da estrutura de biofilmes para desenvolver medidas de controle e reduzir as altas contagens. Esse estudo contribui para a compilação de dados, considerando uma futura proposta para estabelecer um padrão na legislação brasileira para esporos termófilos aeróbios. No entanto, mais estudos precisam ser realizados em diferentes regiões e com uma amostragem maior.

Resultados semelhantes foram encontrados em demais estudos como Yuan et al. (2012) onde o total de 22 amostras de leite em pó fabricados na China, apresentaram populações que variaram de 2,18 a 4,59 log<sub>10</sub> UFC/g. Sadiq et al. (2016) analisaram 25 amostras de leite em pó incluindo fórmula infantil onde as contagens variaram de 1,00 a 4,30 log<sub>10</sub> UFC/g.

Essa condição é explicada pela proliferação de bacilos termofílicos ser selecionada devido a uma sequência de tratamentos térmicos, especialmente durante a pasteurização, evaporação e secagem, onde as temperaturas variam de 80 °C a 180 °C.

Algumas espécies de bacilos mesofílicos como *B. licheniformis*, crescem em uma ampla faixa de temperatura podendo ser detectados em condições utilizadas para o crescimento de micro-organismos termofílicos (55 °C). Neste estudo a identificação de *B. licheniformis* foi através do método mesofílico, porém os isolados contabilizados no método termofílico que não foram identificados a nível de espécie através do gene 16S rRNA, podem ser de alguma espécie mesofílica inserida na condição de crescimento em ampla faixa de temperatura, o que pode contribuir com os maiores índices de termófilos encontrados nas amostras. Essa condição pode ser indicada como uma limitação da metodologia.

A variação entre métodos aplicados, considerando a temperatura de tratamento, podem levar a diferenças na contagem de esporos nas amostras. Exemplos de outros métodos para esporos termófilos, não aplicados neste estudo, incluem aqueles para esporos altamente resistentes ao calor, onde o tratamento térmico é de 100 °C por 30 min. (Scheldeman, Pil, Herman, De Vos & Heyndrickx, 2005) e 106 °C por 30 min. onde são selecionados esporos especialmente termorresistentes de bactérias termofílicas (Iso-IDF, 2009). Todos os métodos apresentam estratégias semelhantes, choque térmico por um tempo específico para eliminar células vegetativas, com posterior plaqueamento em ágar de recuperação não seletivo. A escolha do ágar aliada com a incubação pode contribuir na variabilidade da contagem de esporos. Watterson, Kent, Boor, Wiedmann & Martin (2014) analisaram amostras de leite em pó para contabilização de esporos termófilos aplicando dois tratamentos térmicos diferentes, 80 °C por 12 min. e 100 °C por 30 min. com incubação das placas a 55 °C. Os resultados mostraram que o tratamento a 80 °C por 12 min. apresentou quase duas vezes mais amostras com crescimento de esporos termofílicos indicando que esses testes não transmitem as mesmas informações e, portanto, não são comparáveis. Provavelmente isso se deve ao fato de que os esporos apresentam resistências diferentes entre as espécies, sendo que o tratamento térmico utilizado na análise interfere diretamente na seleção das espécies que serão contabilizadas e identificadas.

Outra condição para as altas contagens de esporos termofílicos é a capacidade que algumas espécies têm de formar biofilmes que podem proteger tanto esporos quanto células vegetativas durante a higienização da indústria. Os esporos termofílicos tendem a aumentar em número durante o processamento do leite em pó, principalmente onde há uso contínuo de equipamentos e onde o saneamento não é realizado adequadamente. Scott et al. (2007) verificaram que as bactérias presentes nas incrustações, após limpeza no local, estavam predominantemente em sua forma de esporos, sugerindo que as incrustações pode ser uma possível fonte de contaminação dos produtos finais de concentrados lácteos. Burgess et al.

(2014) estudaram 10 cepas de *G. stearothermophilus* e uma espécie de *Anoxybacillus* isoladas de uma fábrica de leite em pó e concluíram que as cepas apresentavam capacidade de produzir esporos a partir de biofilmes, as duas espécies são termofílicas.

A presença de bacilos termofílicos em produtos lácteos é indicador de má higiene, contagens altas são inaceitáveis uma vez que pode levar a defeitos do produto causados pela produção de enzimas, como proteases, lipases e ácidos capazes de estragar o produto final.

Não foi encontrado na literatura outro trabalho onde houvesse a contabilização de esporos anaeróbios em leite em pó. Neste estudo, foi utilizada a metodologia Apha (2015a e c) adaptada para semeadura em placa e não utilizado a técnica de número mais provável (NMP) como cita a metodologia oficial, na qual é estimada a densidade populacional através de tubos positivos. A técnica oficial torna o método semi-quantitativo, ou seja, de difícil interpretação uma vez que o cliente necessita de dados quantitativos ao invés de porcentagens de tubos positivos. Devido à diferença metodológica, as duas técnicas não são comparáveis. A técnica de NMP é considerada mais sensível pois não exige a formação da colônia, o que pode ser uma limitação para micro-organismos que se encontram injuriados.

Para garantir a qualidade dos resultados de métodos adaptados, o uso de MR é uma das principais ferramentas utilizadas para garantir a confiabilidade dos ensaios através da comparabilidade entre as medições do valor obtido e do esperado. Conforme Tabela 2, não houve diferença significativa entre as populações, indicando que a adaptação realizada no método para esporos anaeróbios, atingiu níveis na mesma ordem logarítmica do valor de referência.

A capacidade de detectar e identificar os esporos presentes no leite em pó representa uma vantagem econômica para a indústria, bem como uma garantia de higiene para os consumidores. Dos 38 isolados testados neste estudo que foram identificados pelo sequenciamento do gene 16S RNAr foi encontrado a presença de cinco gêneros, entre os quais, foi possível a identificação das espécies *B. licheniformis*, *Weizmannia coagulans*, *B. amyloliquefaciens*, *G. stearothermophilus*, *A. flavithermus*, *C. butyricum*, *C. pabulibutyricum* e *C. sporosphaeroides*. O gênero *Bacillus* predominou nos isolados identificados seguido dos gêneros *Weizmannia*, *Geobacillus*, *Clostridium* e *Anoxybacillus* (Tabela 3). Se um maior número de colônias estivesse sido selecionado durante a inspeção visual de cada placa de ágar ou se o método utilizado para o tratamento térmico fosse diferente, é possível que a variedade de micro-organismos identificados fosse diversa. Apesar de as espécies *B. licheniformis* e *B. amyloliquefaciens* pertencerem ao grupo *Bacillus subtilis*, onde a identificação a nível de

espécie dentro do grupo é difícil devido a alta proximidade evolutiva, no presente trabalho foi possível essa diferenciação.

A alta prevalência do gênero *Bacillus* sp. pode ser atribuída à contaminação por fontes agrícolas, incluindo solo e silagem e as fontes internas durante o processamento de laticínios que permitem a permanência e a multiplicação desses micro-organismos.

Resultados semelhantes podem ser encontrados no estudo de Lücking, Stoeckel, Atamer, Hinrichs & Ehling-Schulz (2013) onde 75% dos isolados nas amostras de leite em pó pertenciam ao gênero *Bacillus*, seguido de *Geobacillus*. As espécies dominantes identificadas foram *B. licheniformis*, *B. subtilis* e *G. stearothermophilus*. Li et al. (2019) isolou 269 bactérias esporuladas do leite em pó onde foram predominantes *B. licheniformis* sendo 68% dos isolados, 16% eram outras espécies de *Bacillus*, 5% eram *Clostridium* spp., 3% *Geobacillus* spp., e com menor porcentagem os demais gêneros como *Lysinibacillus* spp., *Brevibacillus* spp., *Anoxybacillus* e *Aneurinibacillus*.

As espécies identificadas *W. coagulans*, *G. stearothermophilus*, *A. flavithermus*, *C. pabulibutyricum* e *C. sporosphaeroides* já foram citadas como deteriorantes de produtos lácteos entre outros alimentos, podendo causar perdas econômicas para as indústrias (Yoon, 2021; Putri, 2017; Wagner & Wiegel, 2008; Kobayashi, 2017; Wilde, Collins & Hippe, 1997).

As espécies *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* e *C. botulinum* têm sido associadas a deterioração de produtos lácteos, porém, algumas cepas produzem toxinas podendo causar intoxicação alimentar. Segundo Salkinoja-Salonen et al. (1999) a toxina produzida por *B. licheniformis* é estável termicamente e semelhante à toxina emética produzida por *B. cereus*, já *B. amyloliquefaciens* produz a toxina cereulide, embora em níveis mais baixos que *B. cereus* (Coorevits et al., 2008; Witthuhn, Luecking, Atamer, Ehling-Schulz & Hinrichs, 2011). O anaeróbio *C. botulinum* já foi citado como a fonte de dois casos de botulismo infantil tipo E na Itália, a toxina foi purificada e considerada semelhante a toxina produzida por *C. botulinum* (Aureli et al., 1986). A presença dessas espécies merece atenção pois o leite em pó é ingrediente para fórmulas infantis, entre outros produtos, sendo a produção de toxinas uma preocupação.

## 5 CONCLUSÃO

Os resultados mostraram que a contaminação por bactérias formadoras de esporos são frequentes em amostras de leite em pó, sendo os termófilos tanto aeróbios quanto anaeróbios com maiores níveis de contaminação. A adaptação realizada na metodologia *American Public Health Association* (APHA, 2015) apresentou resultado satisfatório, mostrando que não houve

diferença significativa entre o método tradicional e o adaptado para a técnica quantitativa. Foi identificado a presença de espécies tanto deteriorantes quanto espécies com capacidade de produção de toxinas. Este estudo descreveu pela primeira vez a detecção das espécies *W. coagulans*, *B. amyloliquefaciens*, *C. pabulibutyricum*, *C. sporosphaeroides* e *C. butyricum*, fazendo parte da microbiota esporulada do leite em pó no Brasil. Dessa forma, os resultados indicam a necessidade de estabelecer medidas de controle para melhorar as condições de higiene e de processamento do leite em pó, garantindo assim a qualidade do produto, bem como a segurança do consumidor.

**Agradecimentos:** Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul - FAPERGS (Bolsa nº 21/2551-0000531-9) pela ajuda financeira.

**Conflito de interesse:** Os autores declaram não haver conflito de interesse.

## REFERÊNCIAS

Apha. American Public Health Association. **Standard Methods for the Examination of Dairy Products**, 17. ed. Washington: [s. n.], 2004. Method 8.090.

Apha. American Public Health Association. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. Mesophilic Anaerobic Sporeformers, 5. ed. Washington: [s. n.], 2015a. Methods 24.512 and 24.524.

Apha. American Public Health Association. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. Mesophilic Anaerobic Sporeformers, 5. ed. Washington: [s. n.], 2015b. Methods 24.512 and 24.524.

Apha. American Public Health Association. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. Thermophilic Anaerobic Sporeformers, 5. ed. Washington: [s. n.], 2015c. Method 24.524.

Aureli, P., Fenicia, L., Pasolini, B., Gianfranceschi, M., McCroskey, L. M., & Hatheway, C. L. (1986). Two cases of type E infant botulism caused by neurotoxigenic *Clostridium butyricum* in Italy. *Journal of Infectious Diseases*, 154(2), 207-211.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 76 de 26 de novembro de 2018. **Diário Oficial da União**, Brasília, 30 de novembro de 2018. Disponível em: <https://wp.ufpel.edu.br/inspleite/files/2019/04/INSTRU%C3%87%C3%83O-NORMATIVA-N%C2%BA-76-DE-26-DE-NOVEMBRO-DE-2018-Di%C3%A1rio-Oficial-da-Uni%C3%A3o-Imprensa-Nacional.pdf>.

- Burgess, S. A., Brooks, J. D., Rakonjac, J., Walker, K. M., & Flint, S. H. (2009). The formation of spores in biofilms of *Anoxybacillus flavithermus*. *Journal of applied microbiology*, 107(3), 1012-1018.
- Burgess, S. A., Lindsay, D., & Flint, S. H. (2014). Biofilms of thermophilic bacilli isolated from dairy processing plants and efficacy of sanitizers. *In Microbial Biofilms* (pp. 367-377). Humana Press, New York, NY.
- Buehner, K. P., Anand, S., & Garcia, A. (2014). Prevalence of thermotolerant bacteria and spores on 10 Midwest dairy farms. *Journal of dairy science*, 97(11), 6777-6784.
- Cogan, T. M. (1977). A review of heat resistant lipases and proteinases and the quality of dairy products. *Irish Journal of Food Science and Technology*, 95-105.
- Coorevits, A., De Jonghe, V., Vandroemme, J., Reekmans, R., Heyrman, J., Messens, W., ... & Heyndrickx, M. (2008). Comparative analysis of the diversity of aerobic spore-forming bacteria in raw milk from organic and conventional dairy farms. *Systematic and Applied Microbiology*, 31(2), 126-140.
- Cruz, A. G. D., Zacarchenco, P. B., Oliveira, C. A. F. D., & Corassin, C. H. (2019). Microbiologia, higiene e controle de qualidade no processamento de leites e derivados.
- Gorski, L., & Csordas, A. N. D. R. E. W. (2009). Molecular detection: Principles and methods. *Molecular detection of foodborne pathogens*. Boca Raton, FL: CRC Press. p, 1-15.
- Gupta, R. S., Patel, S., Saini, N., & Chen, S. (2020). Robust demarcation of 17 distinct *Bacillus* species clades, proposed as novel Bacillaceae genera, by phylogenomics and comparative genomic analyses: description of *Robertmurraya kyonggiensis* sp. nov. and proposal for an emended genus *Bacillus* limiting it only to the members of the Subtilis and Cereus clades of species. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 70(11), 5753-5798.
- Harwood, C. R., Mouillon, J. M., Pohl, S., & Arnau, J. (2018). Secondary metabolite production and the safety of industrially important members of the *Bacillus subtilis* group. *FEMS microbiology reviews*, 42(6), 721-738.
- ISO (2009) ISO/TS 27265:2009 “Dried milk – Enumeration of the specially thermoresistant spores of thermophilic bacteria”. *In International Standard Organization (ISO) and International Dairy Federation (Ed.)*, Milk and processed milk products. Geneva, Switzerland: International Standard Organization.
- Junior, J. C. R. (2015). **Isolamento e Identificação da Microbiota Esporulada e Fúngica Associada à Deterioração do Leite.**
- Karaman, A. D., & Alvarez, V. B. (2014). Microbiology of evaporated, condensed and powdered milk. *Dairy Microbiology and Biochemistry: Recent Developments*, 271.
- Kobayashi, H., Nakasato, T., Sakamoto, M., Ohtani, Y., Terada, F., Sakai, K., ... & Tohno, M. (2017). *Clostridium pabulibutyricum* sp. nov., a butyric-acid-producing organism isolated from high-moisture grass silage. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 67(12), 4974-4978.

Li, F., Hunt, K., Van Hoorde, K., Butler, F., Jordan, K., & Tobin, J. T. (2019). Occurrence and identification of spore-forming bacteria in skim-milk powders. *International dairy journal*, 97, 176-184.

Lücking, G., Stoeckel, M., Atamer, Z., Hinrichs, J., & Ehling-Schulz, M. (2013). Characterization of aerobic spore-forming bacteria associated with industrial dairy processing environments and product spoilage. *International journal of food microbiology*, 166(2), 270-279.

Marchand, S., De Block, J., De Jonghe, V., Coorevits, A., Heyndrickx, M., & Herman, L. (2012). Biofilm formation in milk production and processing environments; influence on milk quality and safety. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11(2), 133-147.

Mareze, J. (2017). **Identificação Molecular de Deteriorantes Mesófilos em Leite Cru Refrigerado.**

Mehta, D. (2018). *The Influence of Spore-forming Microorganisms on the Quality and Functionality of Cultured Dairy Products*. South Dakota State University.

Moatsou, G., & Moschopoulou, E. (2014). Microbiology of raw milk. *Dairy Microbiology and Biochemistry*, 1-38.

Putri, T. P. (2017). *Understanding thermophilic spore-forming bacteria in milk powders* (Doctoral dissertation, University of Tasmania).

Reyes, Alessandra Frias et al. Avaliação da contaminação por micro-organismos esporulados e indicadores em requeijão cremoso. 2008.

Sadiq, F. A., Li, Y., Liu, T., Flint, S., Zhang, G., Yuan, L., ... & He, G. (2016). The heat resistance and spoilage potential of aerobic mesophilic and thermophilic spore forming bacteria isolated from Chinese milk powders. *International journal of food microbiology*, 238, 193-201.

Salkinoja-Salonen, M. S., Vuorio, R., Andersson, M. A., Kampfer, P., Andersson, M. C., Honkanen-Buzalski, T., & Scoging, A. (1999). Toxigenic strains of *Bacillus licheniformis* related to food poisoning. *Applied and environmental microbiology*, 65(10), 4637-4645.

Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the national academy of sciences*, 74(12), 5463-5467.

Scheldeman, P., Pil, A., Herman, L., De Vos, P., & Heyndrickx, M. (2005). Incidence and diversity of potentially highly heat-resistant spores isolated at dairy farms. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(3), 1480-1494.

Setlow, P. (2003). Spore germination. *Current opinion in microbiology*, 6(6), 550-556.  
Setlow, P., & Johnson, E. A. (2019). Spores and their significance. *Food microbiology: fundamentals and frontiers*, 23-63.

- Scott, S. A., Brooks, J. D., Rakonjac, J., Walker, K. M., & Flint, S. H. (2007). The formation of thermophilic spores during the manufacture of whole milk powder. *International journal of dairy technology*, 60(2), 109-117.
- Stackebrandt, E., & Goebel, B. M. (1994). Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 44(4), 846-849.
- Wagner, I. D., & Wiegel, J. (2008). Diversity of thermophilic anaerobes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1125(1), 1-43.
- Watterson, M. J., Kent, D. J., Boor, K. J., Wiedmann, M., & Martin, N. H. (2014). Evaluation of dairy powder products implicates thermophilic sporeformers as the primary organisms of interest. *Journal of dairy science*, 97(4), 2487-2497.
- Wilde, E., Collins, M. D., & Hippe, H. (1997). *Clostridium pascui* sp. nov., a new glutamate-fermenting sporeformer from a pasture in Pakistan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 47(1), 164-170.
- Witthuhn, M., Luecking, G., Atamer, Z., EHLING-SCHULZ, M. O. N. I. K. A., & Hinrichs, J. (2011). Thermal resistance of aerobic spore formers isolated from food products. *International journal of dairy technology*, 64(4), 486-493.
- Woods, R. G., Burger, M., Beven, C. A., & Beacham, I. R. (2001). The aprX–lipA operon of *Pseudomonas fluorescens* B52: a molecular analysis of metalloprotease and lipase production. *Microbiology*, 147, 345-354.
- YOON, Ki-Hong. Draft genome sequence of *Weizmannia coagulans* BA375 isolated from saltern soil in Korea. *Korean Journal of Microbiology*, v. 57, n. 2, p. 119-121, 2021.
- Yuan, D. D., Liu, G. C., Ren, D. Y., Zhang, D., Zhao, L., Kan, C. P., ... & Zhang, L. B. (2012). A survey on occurrence of thermophilic bacilli in commercial milk powders in China. *Food Control*, 25(2), 752-757.
- Zhang, H., & You, C. (2018). A universal PCR method and its application in sequence-based identification of microorganisms in dairy. *International Dairy Journal*, 85, 41-48.