

OCORRÊNCIA DE *Bacillus sporothermodurans* EM LEITE UAT/UHT BRASILEIRO E A INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO TÉRMICO¹

Patrícia Blumer ZACARCHENCO^{2,*}; Mauro Faber de Freitas LEITÃO²; Maria Tereza DESTRO²; Cristiano ANDRIGHETO²

RESUMO

O *Bacillus sporothermodurans* (BSP) tem sido isolado em todo o mundo, principalmente nos países europeus, como um contaminante usual do leite processado pelo sistema UAT/UHT. Embora o BSP não seja patogênico, o leite contaminado fica fora dos padrões da legislação, que fixa o limite de contagem de microrganismos aeróbios mesófilos em 100ufc/ml. Tal bacilo foi pesquisado em amostras de leite UAT produzido nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil, processado pelos sistemas de aquecimento indireto (trocadores a placas ou tubulares) e direto (injeção ou infusão de vapor). Foi analisado um total de 100 amostras, avaliadas quantitativamente pela técnica de espalhamento superficial no meio diferencial ágar infusão de cérebro e coração - esculina (ágar BHI-E). Na análise qualitativa as amostras foram submetidas a choque térmico (115°C/7min), incubadas e plaqueadas no referido ágar. Os resultados revelaram um total de 45% de

amostras com contagens acima do limite tolerável (100ufc/ml), oscilando entre 2×10^4 e $9,5 \times 10^5$ ufc/ml. No entanto, em função do tipo de sistema de aquecimento, as variações foram muito acentuadas, sendo que na avaliação quantitativa os índices de rejeição foram de 71,4% nas amostras aquecidas indiretamente e naquelas processadas diretamente. Isto se deve, provavelmente, às condições mais drásticas de tratamento térmico utilizada pelos laticínios com sistema direto de aquecimento. Na análise qualitativa, os índices de rejeição foram de 71,7 e 22,2%, respectivamente. Trezentas culturas foram isoladas das amostras contaminadas, revelando características culturais, morfológicas e bioquímicas similares as de BSP, exceto pela capacidade de fermentação lenta da glicose evidenciada pela maioria delas. Deste total, 24 cepas tiveram seu DNA cromossômico avaliado pelo método PCR-RAPD, sendo que os perfis obtidos foram muito similares ao de BSP referência (DSMZ 10599) confirmando tratar-se de *Bacillus sporothermodurans*.

Palavras-chave: PCR-RAPD; leite UAT; *Bacillus sporothermodurans*; tratamento térmico.

SUMMARY

OCCURRENCE OF *BACILLUS SPOROTHERMODURANS* AND THE INFLUENCE OF THE THERMAL PROCESSING PROCEDURE ON ITS PRESENCE IN BRAZILIAN UHT MILK. *Bacillus sporothermodurans* (BSP) has been isolated worldwide, but mainly in European countries as an usual contaminant of milk by the UHT system. Even being non pathogenic, generally its presence results in product rejection based on international microbiological standards limiting the counts to a maximum of 100 cfu/ml. In this research work, the occurrence of BSP was evaluated in UHT milk samples produced in different regions of Brazil (Central, South and Southeast) and processed by the indirect thermal treatment system (plate or tube exchangers) or by the direct system (steam infusion or steam injection). A total of 100 commercial samples were analysed both quantitatively by spread plate technique using Brain Heart Infusion Esculin Agar (BHI-E agar) and qualitatively after thermal

shock treatment (115°C/7min), followed by incubation and plating in that medium. The results showed a total of 45% of the examined samples with counts above 100 cfu/ml, varying from $2 \cdot 10^4$ and $9,5 \cdot 10^5$ cfu/ml. However, 71.4% of the samples processed by indirect system were above limits, while none of the samples heat treated by the direct system, that allows a more drastic temperature condition, were rejected. A similar picture was observed in the qualitative evaluation, with contamination levels of 71,7 and 22,2% for the indirect and direct system, respectively. A total of 300 cultures were isolated from contaminated samples, showing cultural, morphological and biochemical patterns similar to BSP, except a late glucose fermentation capacity showed by most of the isolated strains. When 24 representative strains were submitted to PCR-RAPD evaluation and compared to the reference BSP strain (DSMZ 10599), they were confirmed as *Bacillus sporothermodurans* based on their DNA pattern.

Keywords: PCR-RAPD; UHT milk; *Bacillus sporothermodurans*; heating system.

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o *Bacillus sporothermodurans* (BSP) vem sendo isolado a partir de leite processado pelo sistema UAT/UHT em vários países da Europa e no Brasil. No Brasil, o bacilo foi isolado a partir de amostras de leite UAT produzido em unidades industriais do Estado de São Paulo e Paraná. As amostras contaminadas apresentaram populações em torno de 10^5 UFC/ml sem evidências maiores de alterações organolépticas [1], de acordo, portanto, com os resultados reportados por HAMMER *et al* [3] e PETTERSSON *et al* [9]. Nestas condições, o leite UAT fica fora dos padrões exigidos pela legislação para o produto quanto a população de microrganismos aeróbios mesófilos, que é de 100UFC/ml, segundo a Portaria SVS/MS nº 451/97 [2]

O BSP parece resistir às condições de tempo e temperatura empregadas atualmente no sistema UAT de processamento térmico, pelo método de injeção indireta de vapor, fato que desperta preocupação pela possibilidade de prejuízos com a condenação de lotes do produto, acrescida do fato do consumo de leite em embalagens laminadas (tipo "longa vida"), processado desse modo, estar aumentando significativamente no Brasil, conforme dados da Associação Brasileira de Leite Longa Vida [1].

Em se tratando de um problema relativamente recente, há escassez de dados técnicos a respeito desta bactéria na literatura internacional, principalmente com relação a seu comportamento, suas características fisiológicas e bioquímicas, mecanismos do processo de deterioração dos produtos, sua resistência térmica, características ecológicas, níveis de contaminação e técnicas de isolamento. Nesta pesquisa, foi estudada a ocorrência do BSP em leite UAT processado em diferentes regiões do Brasil, tendo sempre como padrão para comparação a linhagem HHRS de referência de BSP (cepa DSMZ 10599) da Coleção Alemã de Microorganismos e Culturas Celulares (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen).

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - Material de estudo

Os estudos de avaliação da ocorrência de BSP e outros microrganismos em produtos comerciais, foram conduzidos com amostras de leite UAT, adquiridas em locais de venda, na região de Campinas, Estado de São Paulo, ao longo do ano de 1999.

2.2 - Metodologia experimental

Avaliação da ocorrência de *Bacillus sporothermodurans* e outros microrganismos em leite UAT/UHT produzido comercialmente

Procedimento de amostragem

Das 9 marcas selecionadas, as codificadas por I e II são provenientes do Estado de São Paulo; aquelas codificadas por III e IV, são de Minas Gerais; as codificadas por V, VI e VII são, respectivamente, dos Estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul; e as codificadas por VIII e IX são de Goiás. A codificação das marcas analisadas será utilizada neste trabalho visando preservar a identidade dos fabricantes. Foram analisadas um total de 100 unidades de amostra de leite UAT, para cada marca comercial foram analisadas 10 unidades de amostra, com a coleta de 5 unidades a cada 30 dias. No caso das amostras provenientes do Rio Grande do Sul, as análises incidiram sobre um total de 20 unidades.

Metodologia para análise qualitativa e quantitativa

O fluxograma descrito na [Figura 1](#) resume a metodologia experimental da avaliação qualitativa e quantitativa de BSP em leite UAT. Quando havia surgimento de colônias nas placas com ágar infusão de cérebro e coração adicionado de esculina (ágar BHI-E) [13], selecionavam-se 3 colônias para posterior investigação. As culturas suspeitas de BSP foram caracterizadas com base em aspectos culturais [13], microscópicos (morfologia) e bioquímicos (fermentação da glicose, hidrólise de esculina e atividade de oxidase).

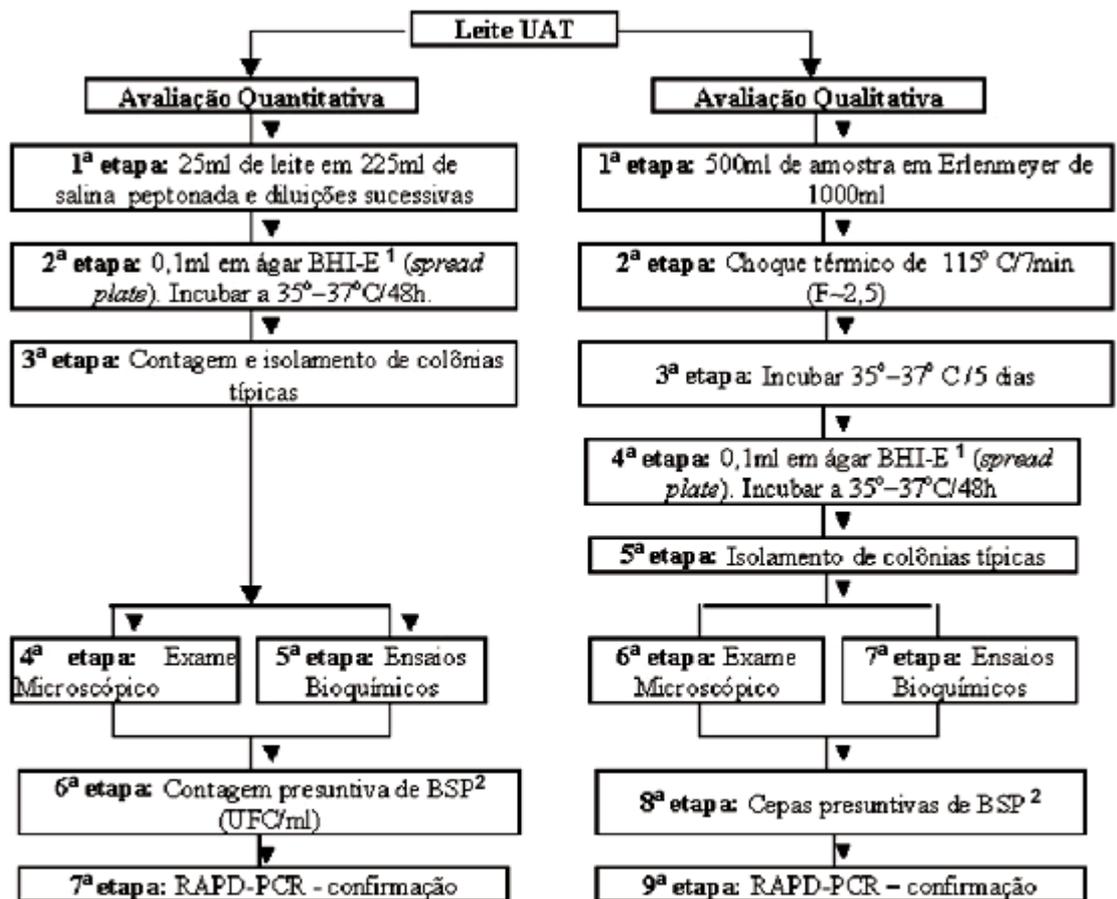


FIGURA 1. Representação esquemática da metodologia empregada para isolamento de BSP a partir de leite UAT e para sua caracterização. 1- Ágar infusão de cérebro e coração (BHI) adicionado de esculina e citrato férrico amoniacal (ágar BHI-E). 2- BSP, *Bacillus sporothermodurans*.

Caracterização bioquímica das cepas

O ensaio de fermentação da glicose foi realizado segundo VANDERZANT e SPLITTSTOESSER [12]. Para verificar a atividade de oxidase das cepas utilizou-se Reagente de Oxidase (DIFCO 3530). Após o isolamento e purificação das culturas, confirmou-se sua capacidade de hidrólise de esculina também empregando-se o ágar BHI-E.

Análise do polimorfismo do DNA por amplificação aleatória (RAPD)

Após a caracterização morfológica e os ensaios bioquímicos, selecionou-se 24 cepas e o BSP padrão (cepa DSMZ10599 da Coleção Alemã de

Microrganismos e Culturas Celulares, Deutsche Sammlug von Mikroorganismen und Zellkulturen), que foram repicadas em placa contendo ágar BHI e incubadas por 24 horas a 35-37°C. Uma colônia de cada cepa foi transferida para tubo Eppendorf estéril, e submetida a extração do DNA empregando-se o Instagene, de acordo com as instruções do fabricante. As demais etapas foram realizadas segundo as metodologias descritas em SAMBROOK, FRITSCH e MANIATIS [10] e KLIJN *et al.* [6], empregando apenas o do iniciador (*primer*) RAPD I [5'-GTCGTTATGCGGTA-3']. Para fotografia dos géis e determinação do peso molecular dos fragmentos de DNA utilizou-se o sistema Electrophoresis Documentation and Analyses System 120, TFX 20M (KODAK). Os padrões de bandas originados foram visualmente comparados e as cepas agrupadas. Os perfis foram, então, numerados arbitrariamente. A similaridade entre as cepas foi avaliada com auxílio do NTSYS-pc program (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System) versão 2.0, tendo sido empregado o coeficiente de DICE.

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Buscou-se verificar a presença do BSP nos produtos industrializados nas regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul. A análise quantitativa possibilitou a constatação de que há leite UAT no mercado varejista em desacordo com os padrões estabelecidos pela Legislação Brasileira de Alimentos (Portaria SVS/MS nº 451/97), como se pode constatar pela análise da [Tabela 2](#). A análise qualitativa revelou a presença de microrganismos esporulados mesófilos com alta resistência térmica (sobreviventes a choque térmico com $F \sim 2,5$), indicando a provável presença de BSP.

TABELA 1. Características gerais das amostras de leite UAT analisadas

Origem das amostras ¹	Condições de processo	
	T(°C) e t(s) ²	Tipo de trocador
I	150/3	injeção de vapor
II	150/3	injeção de vapor
III	150/3	injeção de vapor
IV	137-139/3	aquecimento indireto (tubular)
V	150/3	injeção de vapor
VI (unidade 1)	150/3	injeção de vapor
VI (unidade 2)	138-139/4	aquecimento indireto (placa)
VII	- ₃	- ₃
VIII	138-140/3	aquecimento indireto (tubular)
IX	138-140/4	aquecimento indireto (tubular)

1. Local de produção: I e II (São Paulo); III e IV (Minas Gerais); V (Paraná); VI (Santa Catarina); VII (Rio Grande do Sul); VIII e IX (Goiás)

2. Temperatura e tempo de processo (em graus Celsius e segundos respectivamente) gentilmente informada pelos responsáveis técnicos dos laticínios que tiveram seus produtos analisados

3. O laticínio VII não disponibilizou informações sobre que tipo de equipamento de aquecimento empregava.

TABELA 2. Resultados das avaliações quantitativa e qualitativa de amostras de leite UAT

Origem da Amostra	Nº de unidades analisadas ¹	Sistema de Aquecimento	Amostragem em desacordo com a legislação ³		Amostras contaminadas com presença de mesófilos esporulados ⁵	
			Nº ²	%	Nº	%
I	10	direto	0	0	0	0
II	10	direto	0	0	0	0
III	10	direto	0	0	0	0
IV	10	indireto	10	100	10	100
V	10	direto	0	0	5	50
VI (unidade 1)	5	direto	0	0	5	100
VI (unidade 2)	5	indireto	5	100	5	100
VII	20	- ₄	20	100	20	100
VIII	10	indireto	10	100	10	100
IX	10	indireto	0	0	0	0
Total ¹	100	-	45	45	55	55

1. O número de unidades analisadas de cada laticínio e o total.

2. Número de amostras que apresentaram contagem superior a 100 ufc/ml

3. Portaria SVS/MS nº 451/97 limitando a contagem em 100 ufc/ml

4. O laticínio não forneceu estas informações.

5. Colônias típicas em ágar BHI-E e com esporos suportando choque térmico de 115° C/7min (F ~ 2,5)

3.1 - Análises Quantitativa e Qualitativa do leite UAT produzido comercialmente

As condições de processamento nos diferentes laticínios, estão indicadas na [Tabela 1](#), juntamente com vida-de-prateleira constante da embalagem e os estabilizantes adicionados.

Os resultados das análises quantitativa e qualitativa são apresentados nas [Tabela 2](#), bem como o número de amostras analisadas que se apresentaram em

desacordo com os padrões microbiológicos vigentes, estabelecendo um limite de contagem padrão de 100ufc/ml (Portaria SVS/MS nº 451/97). Embora tal constatação indique a eventual presença de BSP, não há condições de confirmar esta possibilidade com base na simples contagem, mesmo empregando-se o ágar BHI-E na sua execução. Para os resultados da avaliação qualitativa, também na [Tabela 2](#), esta possibilidade já é mais concreta, em decorrência da detecção de colônias suspeitas em ágar BHI-E e pelo emprego de choque térmico com valor $F \sim 2,5$, letal para a grande maioria das espécies de *Bacillus* spp mesófilos.

Os resultados da análise quantitativa revelaram que 45% das unidades de amostras estavam fora dos padrões (limite de 100ufc/ml) com contagens totais variando de $2,0 \times 10^4$ ufc/ml a de $9,5 \times 10^5$ ufc/ml. De um total de 35 unidades de amostra tratadas por aquecimento indireto, 25 delas (71,4%) revelaram altas contagens, estando fora dos padrões. Nas 45 amostras esterilizadas por aquecimento direto nenhuma evidenciou contagem acima do padrão, embora 10 delas (22,2%) evidenciassem a presença de contaminantes. Em 45 amostras provenientes dos laticínios I, II, III, VI (unidade 1), V e IX não se detectou a presença de nenhum microrganismo, por nenhuma das duas metodologias empregadas. Assim, as condições de tempo e temperatura dos aquecimentos indiretos utilizados parecem ser insuficientes para reduzir os níveis de contaminação. Por outro lado, pode-se inferir que o tratamento térmico mais drástico, utilizado pelos laticínios com sistema direto de aquecimento, mostrou-se eficiente. Contudo, para apontar a influência do sistema de aquecimento sobre a redução da contaminação, seria necessário que amostras processadas nas mesmas condições de tempo e temperatura, nos sistemas de aquecimento direto e nos trocadores tubulares, fossem analisadas.

As pesquisas conduzidas por HAMMER *et al* [3] mostraram a relação entre o tipo de equipamento utilizado nos laticínios e a facilidade de resolver problemas de contaminação do leite UAT por esporulados mesófilos, empregando sistemas diretos de aquecimento. A contaminação era eliminada pelo emprego de temperaturas mais elevadas, sendo que

nos sistemas diretos de aquecimento isto era possível sem grande aumento no conteúdo de lactulose. As temperaturas atingidas durante o processo nos sistemas diretos pesquisados, são maiores que as utilizadas na operação dos trocadores de calor tubulares ou a placas (aquecimento indireto). A 150°C atinge-se a temperatura de inativação dos esporos do BSP [7]. Além disso, após a injeção direta de vapor no produto, há a etapa de exaustão para retirada do excesso de água resultante da condensação do vapor quando porções residuais de ar são removidas do meio, o que pode ser relevante já que o BSP é um microrganismo aeróbio estrito [9].

3.1 - Caracterização bioquímica das cepas

Nas análises quantitativa e qualitativa foram isoladas um total de 300 colônias cujo aspecto geral (cor, textura, tamanho) assemelhava-se àquele apresentado pelo BSP [13]. Observando-se os dados da [Tabela 3](#), verifica-se que a maior parte dos isolados apresentou morfologia típica, atividade de oxidase e não fermentaram a glicose após 72 horas de incubação a 35-37°C. Todos os isolados hidrolisaram a esculina. Estes resultados evidenciam que a maioria das cepas isoladas apresentaram características morfológicas e bioquímicas químicas típicas de BSP, conforme relatado por PETERSSON *et al* [9]. A exceção a esta afirmativa seria os testes de fermentação de glicose, já que a maioria das cepas isoladas apresentou a capacidade de fermentar lentamente este açúcar, geralmente com resultados negativos após 72 horas de incubação e positivas após 7 dias. É possível que as condições do teste, principalmente o meio de cultura utilizado explique parcialmente estas variações.

TABELA 3. Caracterização das cepas presuntivamente positivas de BSP

Teste	Origem das cepas				
	Não submetidas a choque térmico		Submetidas a choque térmico		
	Nº	%	Nº	%	
Morfologia típica	124	91,9	165	100	
Oxidase positivo	118	87,4	154	93,3	
Fermentação negativa de glicose	72h 7dias	125 16	92,6 11,9	157 29	95,2 17,6
Hidrólise de esculina	135	100	165	100	
Total de cepas	135	100	165	100	

1. O total de cepas resultantes da Análise Quantitativa, que não foram submetidas a choque térmico, é 135.
2. O total de cepas resultantes da Análise Qualitativa, que foram submetidas a choque térmico, é 165

Estes dados auxiliaram na triagem dos isolados para a análise do polimorfismo do DNA por amplificação aleatória (RAPD). Para esta etapa, foram selecionados aqueles que apresentavam morfologia típica, tiveram atividade positiva de oxidase, hidrolizaram a esculina e não fermentaram a glicose após 7 dias de incubação a 35-37°C.

3.2 - Análise do polimorfismo do DNA por amplificação aleatória (RAPD)

PETTERSSON *et al* [9] verificaram que na identificação do BSP não existem características fenotípicas marcantes que permitam diferenciá-lo de algumas espécies de *Bacillus*. KLIJN *et al*. [6] sugeriram o uso de técnicas moleculares baseadas em ácidos nucleicos, como o RAPD-PCR, sugestão adotada neste trabalho. Selecionaram-se 24 cepas da etapa anterior, representativas das amostras. Na [Tabela 4](#) estão representadas as informações que permitem identificar a origem das cepas empregadas neste estudo. O emprego do controle positivo contendo DNA de BSP permitiu avaliar a similaridade entre este microrganismo e as cepas isoladas nas análises quantitativa e qualitativa.

TABELA 4. Identificação das cepas empregadas para a análise do polimorfismo por RAPD com o "primer" RAPD 1, isoladas a partir de amostras comerciais de leite UAT.

Código adotado	Origem das cepas		Laticínio	Análise de Origem ³
	Amostra ¹	Época de coleta ²		
A	1	2/99	VII	análise qualitativa
B	2	2/99	VII	análise qualitativa
C	2	4/99	VII	análise qualitativa
D	2	4/99	VII	análise qualitativa
E	5	2/99	VII	análise qualitativa
F	5	2/99	VII	análise quantitativa
G	2	5/99	VII	análise quantitativa
H	4	2/99	VII	análise quantitativa
I	5	2/99	VII	análise quantitativa
J	4	2/99	VI	análise qualitativa
L	2	2/99	VI	análise quantitativa
M	3	5/99	V	análise qualitativa
N	4	6/99	VIII	análise qualitativa
O	4	6/99	VIII	análise qualitativa
P	1	5/99	VIII	análise qualitativa
Q	3	5/99	VIII	análise qualitativa
R	2	6/99	VIII	análise quantitativa
S	2	5/99	VIII	análise quantitativa
T	3	5/99	VIII	análise quantitativa
U	3	5/99	VIII	análise quantitativa
V	4	5/99	IV	análise quantitativa
X	1	5/99	IV	análise qualitativa
W	1	5/99	IV	análise qualitativa
Z	2	5/99	IV	análise quantitativa
BSP ⁴	-	-	-	-

1. A cada mês foram coletadas 5 amostras

2. Refere-se ao mês e ano de fabricação

3. Refere-se a análise que permitiu o isolamento da cepa

4. BSP = *Bacillus sporothermodurans* a cepa DSMZ10599 da Coleção Alemã de Microrganismos e Culturas Celulares (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen)

Empregando-se o iniciador RAPD 1 identificaram-se 4 perfis diferentes de DNA para as cepas. Ao perfil **1** pertenciam 17 cepas (cepas A a N, S, V, W e Z); ao perfil **2**, 6 cepas (cepas O a Q, T, U e X) e ao perfil **3**, somente 1 cepa (cepa R). A cepa de BSP utilizada como controle positivo é o perfil 4. Os pesos moleculares das bandas presentes nos diferentes perfis variaram entre 470 pb e 1645 pb ([Tabela 5](#), [Figura 2](#)) sendo que as bandas de menor peso molecular (470pb, 495pb, 532pb, 598pb e 707pb) estavam presentes em todos os perfis. Após a obtenção dos perfis das 25 cepas foi realizada a análise de similaridade. O coeficiente de Dice empregado nesta análise atribui maior peso à ocorrência de bandas de um mesmo peso molecular em dois perfis ("matching") que à ocorrência da banda em apenas um dos perfis. Foi construído, então, o dendograma ([Figura 3](#)) com base na análise de clusters UPGMA (Unweighted Pair Groups Method using Arithmetic Average). Conforme pode ser

verificado na [Figura 3](#), 2 grupos podem ser reconhecidos, A e B. O grupo A pode ser dividido em 2 sub-grupos, I e II, aos quais pertencem 95,8% das cepas estudadas.

TABELA 5. Pesos moleculares das bandas dos 4 perfis RAPD obtidos com o iniciador RAPD 1 do DNA das 24 cepas presuntivamente identificadas como BSP e isoladas a partir de amostras comerciais de leite UAT.

Bandas	PERFIL ¹			
	1	2	3	4
1			1645	
2			1392	
3			1321	
4			932	932
5	922			
6		906		
7	874			
8	707	707	707	707
9	598	598	598	598
10	532	532	532	532
11	495	495	495	495
12	470	470	470	470

1.Os valores de pesos moleculares estão em pares de bases (pb)

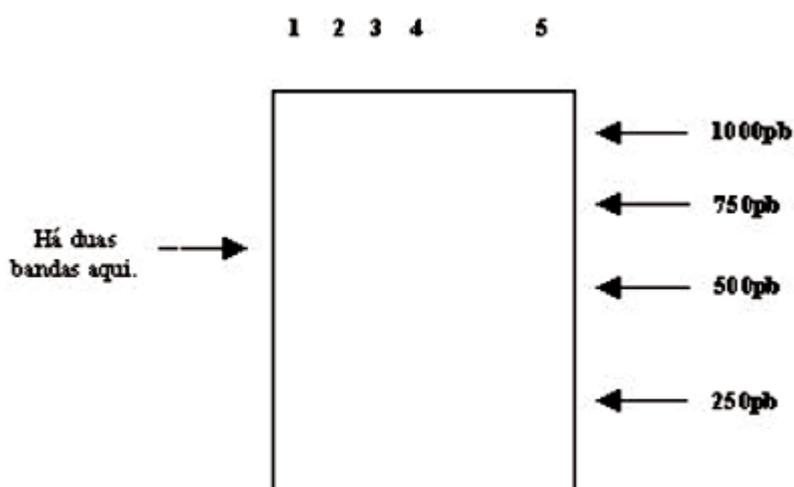


FIGURA 2. Perfis RAPD (1 a 4) obtidos com o "primer" RAPD 1 para cepas presuntivamente identificadas como BSP e isoladas a partir de amostras comerciais de leite UAT . 5- marcador de peso molecular. Banda a=495pb, banda b=470pb.

variação no número de bandas dos diferentes perfis não é preocupante [8]. Desta forma, verifica-se que todas as cepas deste estudo podem ser consideradas como pertencentes à espécie *Bacillus sporothermodurans*, de acordo com os resultados obtidos com o primer RAPD 1 e usando o critério de TENOVER *et al* [11].

4 – CONCLUSÕES

Levando em consideração os objetivos propostos e os resultados experimentais atingidos, a presente pesquisa permitiu as seguintes conclusões:

- 1.** Das 100 unidades de amostras analisadas (análises quantitativas), 45% estavam, formalmente, fora dos padrões estabelecidos pela Portaria SVS/MS nº 451/97, e 55% das amostras analisadas após choque térmico a 115°C/ 7min foram positivas para a presença de esporos.
- 2.** Dos produtos analisados, que foram processados a 150°C / 3seg, por aquecimento direto, nenhum mostrou-se fora dos padrões da legislação, e apenas 10 unidades de amostras (22,2%) foram positivas para a presença de esporos mesófilos termorresistentes. Por outro lado, 25 (71,4%) amostras tratadas a 137-139°C / 3-4seg, revelaram altas contagens, estando fora dos padrões.
- 3.** As condições de processo (tempo e temperatura) é que determinam a redução da contaminação. No sistema direto de aquecimento observou-se condições mais drásticas de temperatura, o que explica os menores níveis de contaminação das amostras processadas neste sistema.
- 4.** A maioria das cepas isoladas apresentou características morfológicas e bioquímicas típicas de BSP, conforme relatado por PETERSSON *et al* [9] , a exceção dos testes de fermentação de glicose onde a maioria das cepas evidenciou fermentação tardia da glicose (7 dias).

5. As 24 cepas testadas pertencem à espécie *Bacillus sporothermodurans* de acordo com os resultados obtidos com o primer RAPD 1.

5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] ABLV (Associação Brasileira de Leite Longa Vida). Comunicação pessoal. 1997. [[Links](#)]

[2] Brasil. Portaria nº451, de 19 de Setembro de 1997. Estabelece padrões microbiológicos de alimentos. **Diário Oficial** (da República Federativa do Brasil), Brasília, 22 set. 1997. [[Links](#)]

[3] HAMMER, P., LEMBKE, F., SUHREN, G., HEESCHEN. Characterization of a heat resistant mesophilic *Bacillus* species affecting quality of UHT-milk - a preliminary report. **Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte**, v.47, p.303-311, s/n., s/m., 1995. [[Links](#)]

[4] HERMAN, L.; HEYNDRIKX, M.; WAES, G. Typing of *Bacillus sporothermodurans* and other *Bacillus* species isolated from milk by repetitive elements sequence based PCR. **Letters in Applied Microbiology**, v. 26, p. 183-188, s/n. 1998. [[Links](#)]

[5] HERMAN, L.M., VAEREWIJCK, M.J.M., MOERMANS, R.J.B., WAES, G.M.A.V.J.: Identification and detection of *Bacillus sporothermodurans* spores in 1, 10 and 100 milliliters of raw milk by PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n.8, p.3139-3143, 1997. [[Links](#)]

[6] KLIJN, N., HERMAN, L., LANGEVELD, L., VAEREWIJCK, M., WAGENDORP, A.A., HUEMER, I., WEERKAMP, A.H. Genotypical and phenotypical characterization os *Bacillus sporothermodurans* strains, surviving UHT sterilisation. **International Dairy Journal**, v.7, p. 421-428, s/n, s/m.. 1997. [[Links](#)]

[7] LEMBKE, F. Comunicação pessoal. 1998. [[Links](#)]

- [8] PENNER, G.A. ; BUSH, A. ; WISE, R. ; KIM, W. ; DOMIER, L. ; KASHA, K. ; LAROCHE, A. ; SCOLES, G. ; MOLNAR, S.J. ; FEDAK, G. Reproducibility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis among laboratories. **PCR Methods and Applications**, v.2, s/n., p.341-345. 1993. [[Links](#)]
- [9] PETTERSSON, B. ; LEMBKE, F. ; HAMMER, P. ; STACKEBRANDT, E. E PRIEST, F. G.. *Bacillus sporothermodurans*, a new species producing highly heat-resistant endospores. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 46, n.3, p.759-764, 1996. [[Links](#)]
- [10] SAMBROOK, J. ; FRITSCH, E.F. ; MANIATIS, T. Commonly used techniques in molecular cloning: Quantitation of DNA and RNA. In:_____ . **Molecular Cloning: A laboratory manual**. . Nova Iorque, E.U.A: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. [[Links](#)]
- [11] TENOVER, F.C. ; ARBEIT, R.D. ; GOERING, R.V. ; MICKELSEN, P. A. ; MURRAY, B.E. ; PERSING, D.H. ; SWAMINATHAN, B. Interpreting chromosomal DNA restriction Patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n.09 , p. 2233-2239. 1995 [[Links](#)]
- [12] VANDERZANT, C. E SPLITTSTOESSER, D. F. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3^a ed. Washington: American Public Health Association (APHA), 1992, 1919p. [[Links](#)]
- [13] ZACARCHENCO, P.B. ; LEITÃO, M.F.F. Avaliação e otimização da metodologia para contagem de *Bacillus sporothermodurans*. Evaluation of methodology to quantify *Bacillus sporothermodurans*. **Revista do Instituto de Laticínios "Cândido Tostes"., Dairy Journal of "Cândido Tostes" Institute. Anais do XVI Congresso Nacional de Laticínios**, v. 54, n. 309, p.134-140, 1999. [[Links](#)]

¹ Recebido para publicação em 03/02/2000. Aceito para publicação em 25/08/2000.

² Laboratório de Higiene e Legislação, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA), UNICAMP, C.P.6121, CEP: 13083-970, fone: (19) 788-3994, e-mail: patylene@hotmail.com

³ Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP – SP – Brasil.

* A quem a correspondência deve ser encaminhada