

**INVESTIGAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DO *Bacillus cereus* NO PROCESSO DE PRODUÇÃO E VIDA COMERCIAL DO LEITE UAT.** Marita Vedovelli Cardozo, Oswaldo Durival Rossi Júnior, Ana Maria Centola Vidal Martins. – Microbiologia - Ciências Biológicas - Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Câmpus de Jaboticabal

Por ser um alimento rico em componentes nutritivos, o leite é um ótimo meio de cultura para vários microrganismos. Quando obtido ou processado em más condições higiênico-sanitárias, pode tornar-se importante veículo de transmissão de patogenias ao homem ( HOFFMANN et al., 1999; PONSANO et al., 1999; FRANCO et al., 2000) .Os processos de beneficiamento garantem a qualidade do leite. O tratamento térmico é relevante na evolução da tecnologia alimentar . Ele é eficiente se for respeitado o binômio tempo X temperatura, para que sejam eliminados os microrganismos e preservadas as características sensoriais e o valor nutricional do produto. No mercado são encontrados leites tratados pelo calor, como é o caso do leite pasteurizado, e leite submetido a ultra alta temperatura (UAT) ou longa vida (PRATA, 1998). O tratamento térmico é um processo de grande importância na evolução da tecnologia alimentar , garantindo a qualidade dos produtos a ele submetido. O termo UAT é usado para designar produtos lácteos submetidos ao tratamento em alta temperatura e embalados assepticamente (DUNKLEY e STEVENSON, 1987). Apesar de o tratamento UAT eliminar totalmente as formas vegetativas de microrganismos presentes no leite, formas esporuladas, altamente resistentes ao calor poderão estar presentes no produto, decorrentes das condições precárias de obtenção da matéria-prima (FOSCHINO et al., 1990; SCHOCKEN- ITURRINO et al., 1996). E uma das principais bactérias esporuladas resistentes ao calor e de importância na microbiologia alimentar, pertencem ao gênero *Bacillus*, a espécie *B. cereus* (ROBINSON e PHILL, 1987)

O presente trabalho, tem por objetivo verificar, durante as etapas da produção e da vida comercial do leite UAT, pontos ou situações que possam comprometer sua qualidade no que se refere à contaminação por *Bacillus cereus* e, em seguida, avaliar o potencial enterotoxigênico das cepas isoladas e realizar estudo epidemiológico das mesmas através de PCR-RAPD.

Para isto, foram analisados, quanto a presença e população de *Bacillus cereus*, seis lotes de leite, cada um destes lotes composto de 10 tipos de amostras (leite cru no início e no final do enchimento do tanque de recepção, leite pasteurizado no início e final do enchimento do tanque de armazenagem, leite UAT recém obtido e aos 30, 60, 90,120 e 150 dias de armazenagem), em número de 5 por ponto de colheita, totalizando 300 amostras. No laboratório, para a contagem de *Bacillus cereus*, inicialmente foram preparadas diluições, pipetando-se 25 mL da amostra e transferindo para um frasco tipo Erlenmeyer contendo 225 mL de água peptonada a 0,1% (diluição  $10^{-1}$ ). A partir desta diluição inicial foram preparadas diluições até  $10^{-7}$ , empregando-se o mesmo diluente. Em seguida, 0,1 mL de cada uma das diluições foram inoculados em placas de Petri contendo ágar manitol-gema de ovo-polimixina B (MYP). Após distribuição do inóculo com alça de Drigalsky, as placas foram incubadas a 30°C por 18 a 40 horas e, ao final do período, foram contadas as colônias que se apresentavam róseas, de aspecto rugoso e seco, medindo entre 3 e 6 mm de diâmetro, rodeadas por um halo esbranquiçado formado pela ação da lecitinase. Cinco colônias com estas características foram transferidas para tubos de ensaio contendo ágar soja triptona (TSA) inclinado e, após incubação, foram submetidas às provas da catalase, da motilidade, da redução do nitrato a nitrito, de Voges-Proskauer, da fermentação anaeróbica da glicose, da hemólise em sangue de carneiro e do crescimento rizóide, para a caracterização como pertencentes ao grupo do *Bacillus cereus*. Para a pesquisa do *Bacillus cereus* 10 mL de cada uma das amostras de leite foram enriquecidas em 90 mL de caldo soja triptona adicionado de polimixina B na proporção de 20 ug/mL e o conjunto incubado a 30°C por 24 a 48 horas. Após a incubação foi realizado plaqueamento em ágar MYP e as colônias sugestivas caracterizadas conforme já descrito.

As populações de *Bacillus cereus* variaram de  $< 1,0 \times 10^1$  a  $2,0 \times 10^9$  UFC/mL nas amostras de leite cru, de  $1,0 \times 10^1$  a  $1,0 \times 10^4$  UFC/mL nas de leite pasteurizado, e de  $< 1,0 \times 10^1$  a  $2,0 \times 10^2$  UFC/mL nas de leite UAT, conforme apresentado nas tabelas 1 e 2.

Tabela 1 – *Bacillus cereus* em amostras de leite colhidas durante o fluxograma de produção e vida comercial do leite UAT.

Tipo de amostra	Nº da amostra	Colônias Sugestivas UFC/mL	Colônias Sugestivas UFC/mL	Colônias Sugestivas UFC/mL
Leite cru final	1	$9,0 \times 10^7$	$<1,0 \times 10^1$	$7,8 \times 10^5$
	2	$1,2 \times 10^8$	$<1,0 \times 10^1$	$1,0 \times 10^6$
	3	$2,0 \times 10^9$	$1,0 \times 10^1$	$3,2 \times 10^5$
	4	$1,8 \times 10^8$	$<1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$
	5	$1,2 \times 10^8$	$<1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$
Leite pasteurizado início	1	$1,0 \times 10^3$	$4,0 \times 10^3$	$<1,0 \times 10^1$
	2	$3,0 \times 10^2$	$5,0 \times 10^3$	$<1,0 \times 10^1$
	3	$1,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^4$	$2,0 \times 10^1$
	4	$3,0 \times 10^2$	$7,0 \times 10^3$	$2,5 \times 10^2$
	5	$2,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^3$	$3,0 \times 10^1$
Leite pasteurizado final	1	$1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$	$9,3 \times 10^2$
	2	$3,0 \times 10^3$	$<1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$
	3	$4,0 \times 10^2$	$<1,0 \times 10^1$	$1,0 \times 10^1$
	4	$5,0 \times 10^2$	$<1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$
	5	$6,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^4$	$<1,0 \times 10^1$
Leite UAT	1	$< 1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$
	2	$< 1,0 \times 10^1$	$1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$
	3	$< 1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$
	4	$1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$
	5	$< 1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$
Leite UAT após 30 dias	1	$2,0 \times 10^2$	$<1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$
	2	$2,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$
	3	$1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$
	4	$1,4 \times 10^2$	$<1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$
	5	$< 1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$
Leite UAT após 60 dias	1	$< 1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$
	2	$< 1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$
	3	$< 1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$
	4	$< 1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$
	5	$< 1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$
Leite UAT após 90 dias	1	$< 1,0 \times 10^1$	$9,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$
	2	$< 1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$
	3	$< 1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$
	4	$< 1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$
	5	$< 1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$
Leite UAT após 120 dias	1	$< 1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$
	2	$< 1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$
	3	$< 1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$
	4	$< 1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$
	5	$1,0 \times 10^0$	$<1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$
Leite UAT após 150 dias	1	$< 1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$
	2	$< 1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$
	3	$< 1,0 \times 10^1$	$1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$
	4	$< 1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$
	5	$< 1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$

\* dados referentes às colheitas A, B e C, respectivamente

Tabela 2 – *Bacillus cereus* em amostras de leite colhidas durante o fluxograma de produção e vida comercial do leite UAT.

Tipo de amostra	Nº da amostra	Colônias Sugestivas UFC/mL	Colônias Sugestivas UFC/mL	Colônias Sugestivas UFC/mL
Leite cru final	1	1,0x10 <sup>1</sup>	<1,0x10 <sup>1</sup>	<1,0 x 10 <sup>1</sup>
	2	<1,0x10 <sup>1</sup>	1,0x10 <sup>1</sup>	1,0 x 10 <sup>1</sup>
	3	<1,0x10 <sup>1</sup>	<1,0x10 <sup>1</sup>	1,0 x 10 <sup>1</sup>
	4	<1,0x10 <sup>1</sup>	1,0x10 <sup>1</sup>	1,0 x 10 <sup>1</sup>
	5	<1,0x10 <sup>1</sup>	<1,0x10 <sup>1</sup>	<1,0 x 10 <sup>1</sup>
Leite pasteurizado início	1	1,0x10 <sup>1</sup>	1,0x10 <sup>1</sup>	<1,0 x 10 <sup>1</sup>
	2	1,0x10 <sup>1</sup>	2,0x10 <sup>1</sup>	<1,0 x 10 <sup>1</sup>
	3	1,0x10 <sup>1</sup>	2,0x10 <sup>1</sup>	<1,0 x 10 <sup>1</sup>
	4	1,0x10 <sup>1</sup>	2,0x10 <sup>1</sup>	1,0 x 10 <sup>1</sup>
	5	2,0x10 <sup>1</sup>	2,0x10 <sup>1</sup>	<1,0 x 10 <sup>1</sup>
Leite pasteurizado final	1	1,0x10 <sup>1</sup>	1,0x10 <sup>1</sup>	2,0 x 10 <sup>1</sup>
	2	1,0x10 <sup>1</sup>	1,0x10 <sup>1</sup>	1,0 x 10 <sup>1</sup>
	3	1,0x10 <sup>1</sup>	1,0x10 <sup>1</sup>	2,0 x 10 <sup>1</sup>
	4	1,0x10 <sup>1</sup>	1,0x10 <sup>1</sup>	3,0 x 10 <sup>1</sup>
	5	1,0x10 <sup>1</sup>	2,0x10 <sup>1</sup>	1,0 x 10 <sup>1</sup>
Leite UAT	1	<1,0x10 <sup>1</sup>	<1,0x10 <sup>1</sup>	2,0 x 10 <sup>1</sup>
	2	<1,0x10 <sup>1</sup>	1,0x10 <sup>1</sup>	4,0 x 10 <sup>1</sup>
	3	<1,0x10 <sup>1</sup>	<1,0x10 <sup>1</sup>	1,0 x 10 <sup>1</sup>
	4	<1,0x10 <sup>1</sup>	<1,0x10 <sup>1</sup>	1,0 x 10 <sup>1</sup>
	5	<1,0x10 <sup>1</sup>	1,0x10 <sup>1</sup>	2,0 x 10 <sup>1</sup>
Leite UAT após 30 dias	1	<1,0x10 <sup>1</sup>	1,0x10 <sup>1</sup>	< 1,0 x 10 <sup>1</sup>
	2	<1,0x10 <sup>1</sup>	<1,0x10 <sup>1</sup>	< 1,0 x 10 <sup>1</sup>
	3	<1,0x10 <sup>1</sup>	<1,0x10 <sup>1</sup>	< 1,0 x 10 <sup>1</sup>
	4	<1,0x10 <sup>1</sup>	<1,0x10 <sup>1</sup>	<1,0 x 10 <sup>1</sup>
	5	<1,0x10 <sup>1</sup>	<1,0x10 <sup>1</sup>	< 1,0 x 10 <sup>1</sup>
Leite UAT após 60 dias	1	<1,0x10 <sup>1</sup>	<1,0x10 <sup>1</sup>	< 1,0 x 10 <sup>1</sup>
	2	1,0x10 <sup>1</sup>	<1,0x10 <sup>1</sup>	< 1,0 x 10 <sup>1</sup>
	3	1,0x10 <sup>1</sup>	<1,0x10 <sup>1</sup>	<1,0 x 10 <sup>1</sup>
	4	<1,0x10 <sup>1</sup>	<1,0x10 <sup>1</sup>	< 1,0 x 10 <sup>1</sup>
	5	<1,0x10 <sup>1</sup>	<1,0x10 <sup>1</sup>	< 1,0 x 10 <sup>1</sup>
Leite UAT após 90 dias	1	<1,0x10 <sup>1</sup>	<1,0x10 <sup>1</sup>	< 1,0 x 10 <sup>1</sup>
	2	<1,0x10 <sup>1</sup>	<1,0x10 <sup>1</sup>	< 1,0 x 10 <sup>1</sup>
	3	1,0x10 <sup>1</sup>	<1,0x10 <sup>1</sup>	< 1,0 x 10 <sup>1</sup>
	4	<1,0x10 <sup>1</sup>	<1,0x10 <sup>1</sup>	< 1,0 x 10 <sup>1</sup>
	5	<1,0x10 <sup>1</sup>	<1,0x10 <sup>1</sup>	< 1,0 x 10 <sup>1</sup>
Leite UAT após 120 dias	1	1,0x10 <sup>1</sup>	<1,0x10 <sup>1</sup>	< 1,0 x 10 <sup>1</sup>
	2	1,0x10 <sup>1</sup>	<1,0x10 <sup>1</sup>	< 1,0 x 10 <sup>1</sup>
	3	<1,0x10 <sup>1</sup>	<1,0x10 <sup>1</sup>	< 1,0 x 10 <sup>1</sup>
	4	<1,0x10 <sup>1</sup>	<1,0x10 <sup>1</sup>	< 1,0 x 10 <sup>1</sup>
	5	<1,0x10 <sup>1</sup>	<1,0x10 <sup>1</sup>	< 1,0 x 10 <sup>1</sup>
Leite UAT após 150 dias	1	1,0x10 <sup>1</sup>	<1,0x10 <sup>1</sup>	< 1,0 x 10 <sup>1</sup>
	2	<1,0x10 <sup>1</sup>	<1,0x10 <sup>1</sup>	< 1,0 x 10 <sup>1</sup>
	3	<1,0x10 <sup>1</sup>	<1,0x10 <sup>1</sup>	< 1,0 x 10 <sup>1</sup>
	4	<1,0x10 <sup>1</sup>	<1,0x10 <sup>1</sup>	< 1,0 x 10 <sup>1</sup>
	5	<1,0x10 <sup>1</sup>	<1,0x10 <sup>1</sup>	< 1,0 x 10 <sup>1</sup>

\* dados referentes às colheitas D,E e F respectivamente

Os resultados obtidos evidenciaram a presença de *Bacillus cereus* nos diferentes tipos de leite colhidos ao longo do processo de produção do leite UAT, inclusive neste último recém obtido, demonstrando a capacidade do microrganismo de resistir aos tratamentos térmicos e a necessidade de medidas higiênico-sanitárias mais rigorosas na obtenção do produto.

### **Referências Bibliográficas**

DUNKLEY, W.L.; STEVENSON, K.E. Ultra high temperature processing and aseptic packaging of dairy products. *J. Dairy Sci.*, v.70, p.2192-2202, 1987.

FOSCHINO, R.; GALLI, A.; OTTOGALLI, G. Research on the microflora of UHT milk. *Ann. Microbiol.*, v.40, p.47-59. 1990.

FRANCO, R.M.; CAVALCANTI, R.M.S.; WOOD, P.C.B. et al. Avaliação da qualidade higiênicosanitária de leite e derivados. *Hig. Aliment.*, v.14, p.70-77, 2000.

HOFFMANN, F.L.; GARCIA-CRUZ, C.H.; VINTURIM, T.M. et al. Microbiologia do leite pasteurizado tipo C, comercializado na região de São José do Rio Preto-SP. *Hig. Aliment.*, v.13, p.51-54, 1999

PONSANO, E.H.G.; PINTO, M.F.; FERREIRA de LARA, J.A. et al. Variação sazonal e correlação entre propriedades do leite utilizadas na avaliação de qualidade. *Hig. Aliment.*, v.13, p. 35-40, 1999.

PRATA, L.F. Leite UHT: solução ou problema? Uma análise da situação. *Hig. Aliment.*, v.12, p.10-15, 1998.

ROBINSON, R.K.; PHILL, M.A.D. *Microbiologia lactológica*. Zaragoza: Acribia, 1987. p.18-32.

SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; NADER FILHO, A.; DIMENSTEIN, A.R. Ocorrência de bactérias esporuladas do gênero *Bacillus* e *Clostridium* em amostras de leite longa vida. *Hig. Aliment.*, v.10, p.25-27, 1996.

**Bolsa:** CNPq