

Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Engenharia de Alimentos
Departamento de Ciência de Alimentos

Caracterização molecular de linhagens de
Bacillus sporothermodurans isoladas de
leite UHT

Candidato: Cleber Rabelo da Roza

Orientador: Dr. Gilson Paulo Manfio

Tese apresentada à
Faculdade de Engenharia de
Alimentos da Universidade
Estadual de Campinas para
obtenção do Título de
Doutor em Ciências de
Alimentos.

Campinas, SP
2004

Roza, Cleber Rabelo da
R817c Caracterização molecular de linhagens de *Bacillus sporothermodurans* isoladas de leite UHT / Cleber Rabelo da Roza.
– Campinas, SP: [s.n.], 2004.

Orientador: Gilson Paulo Manfio
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Leite. 2. *Bacillus sporothermodurans*. 3. UHT. 4. Rep-Pcr
I. Manfio, Gilson Paulo. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

CARS-FEA

BANCA EXAMINADORA

Dr. Gilson Paulo Manfio (Orientador)

Dra. Lara Durães Sette (Titular)

Dra. Valéria Maia Merzel (Titular)

Dra. Suzete Aparecida Lanza Destéfano (Titular)

Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte (Titular)

Dra. Alda Luisa Lerayer (Suplente)

Dr. Vanderley Perez Canhos (Suplente)

*"Ciência e tecnologia fizeram progressos surpreendentes,
mas a humanidade vai pelo caminho descendente.
Há indubitavelmente muitos estudantes e
cientistas brilhantes no mundo de hoje.
Mas ciência apenas não é o bastante.
Deve haver discernimento para utilizar
as descobertas da ciência para propósitos corretos.
Ciência sem discernimento, existência humana sem disciplina,
amizade sem gratidão, música sem melodia,
uma sociedade sem moralidade e justiça,
não podem ser benéficos às pessoas."*

Sathya Sai Baba

Dedico aos meus pais, José e Terezinha

Pelo incentivo e amor a mim dedicados

Por todos esses anos...

AGRADECIMENTOS

A todos aqueles que acreditaram e confiaram em mim, proporcionando conforto nos momentos mais difíceis e partilhando as muitas alegrias que fizeram parte dessa caminhada.

À Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP e à Fundação André Tosello, por ceder a infra-estrutura para execução do projeto. À Universidade do Vale do Rio dos Sinos e à CAPES, pelo apoio financeiro. À Tetra Pak Ltda., pelas linhagens bacterianas e informação associada. À Dra. Suzete Destéfano, do Instituto Biológico de Campinas, pela colaboração e parceria de trabalho. Ao Dr. Gilson Paulo Manfio, pela orientação e por partilhar o seu conhecimento.

Agradecimentos Especiais

Às minha amigas e colegas Fabiana Fantinatti-Garboggini, Valéria Maia de Oliveira, Lara Durães Sette, Manuela da Silva e Ana Paula Uetanabaro, pela grande ajuda e parceria de trabalho.

Ao amigo e colega Takeshi Matsuura, por tantos auxílios, estímulo e prova de amizade.

Aos amigos da Divisão de Recursos Microbianos do CPQBA/UNICAMP, Instituto Biológico de Campinas e Fundação André Tosello, pelo convívio e trocas diárias.

Às minhas amigas e colegas Maísa Pedroso e Regina Alcântara, do Centro de Ciências da Saúde da UNISINOS.

Aos amigos Paulo Blank, Paulo Pantarotto Jr. e Sérgio Alves, pelos bons momentos, incentivo e parceria nessa caminhada.

Muito obrigado a todos vocês.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	VI
SUMÁRIO	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
ÍNDICE DE TABELAS.....	IX
LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS	X
RESUMO.....	XI
ABSTRACT.....	XII
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 <i>BACILLUS SPOROTHERMODURANS</i> E LEITE UHT	4
2.2 PROCESSAMENTO DE LEITE POR ULTRA ALTA TEMPERATURA (UAT).....	7
2.3 DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE BACILOS POR PCR ESPECÍFICO	8
2.4 TIPAGEM GENÔMICA DE BACTÉRIAS POR PCR DE ELEMENTOS REPETITIVOS	10
2.4.1 Seqüências palindrômicas extragênicas repetitivas (REP)-PCR	11
2.4.2 Seqüências consenso intergênicas repetitivas enterobacterianas (ERIC).....	12
2.4.3 Elementos BOX	13
2.4.4 rep-PCR	13
3 OBJETIVOS	20
4 ARTIGO: ISOLATION, IDENTIFICATION AND DIVERSITY OF <i>BACILLUS SPOROTHERMODURANS</i> STRAINS ISOLATED FROM UHT FLUID MILK IN BRAZIL EVALUATED BY REP-PCR TYPING	21
4.1 ABSTRACT	22
4.2 INTRODUCTION.....	23
4.3 MATERIAL AND METHODS	25
4.4 RESULTS AND DISCUSSION	28
4.5 ACKNOWLEDGMENTS	31
4.6 REFERENCES.....	31
5 CONCLUSÕES GERAIS	44
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
7 ANEXOS.....	55

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURE 01. HRS-PCR USING SPECIFIC PRIMERS FOR <i>BACILLUS SPOROTHERMODURANS</i> . NUMBERS REFER TO STRAINS LISTED IN TABLE 1. M = MOLECULAR MARKER 100 BP (AMERSHAM BIOSCIENCE).	37
FIGURE 02. HRS-PCR USING SPECIFIC PRIMERS FOR <i>BACILLUS SPOROTHERMODURANS</i> . NUMBERS REFER TO STRAINS LISTED IN TABLE 1. M = MOLECULAR MARKER 100 BP (AMERSHAM BIOSCIENCE).	37
FIGURE 03. HRS-PCR USING SPECIFIC PRIMERS FOR <i>BACILLUS SPOROTHERMODURANS</i> . NUMBERS REFER TO STRAINS LISTED IN TABLE 1. M = MOLECULAR MARKER 100 BP (AMERSHAM BIOSCIENCE).	38
FIGURE 4A. BOX-PCR FINGERPRINTS OF <i>BACILLUS SPOROTHERMODURANS</i> STRAINS. NUMBERS REFER TO STRAINS AS MENTIONED IN TABLE 1. MOLECULAR MARKER 100BP (KILOBASE™ DNA MARKER - AMERSHAM BIOSCIENCE) LANE M, 100BP LANE M' AND 1KB (GENERULER™ DNA LADDER - FERMENTAS) LANE M".	38
FIGURE 4B. BOX-PCR FINGERPRINTS OF <i>BACILLUS SPOROTHERMODURANS</i> STRAINS. NUMBERS REFER TO STRAINS AS MENTIONED IN TABLE 1. MOLECULAR MARKER 100BP (KILOBASE™ DNA MARKER - AMERSHAM BIOSCIENCE) LANE M, 100BP LANE M' AND 1KB (GENERULER™ DNA LADDER - FERMENTAS) LANE M".	39
FIGURE 5A. ERIC-PCR FINGERPRINTS OF <i>BACILLUS SPOROTHERMODURANS</i> STRAINS. NUMBERS REFER TO STRAINS AS MENTIONED IN TABLE 1. MOLECULAR MARKER 100BP (KILOBASE™ DNA MARKER - AMERSHAM BIOSCIENCE) LANE M, 100BP LANE M' AND 1KB (GENERULER™ DNA LADDER - FERMENTAS) LANE M".	40
FIGURE 5B. ERIC-PCR FINGERPRINTS OF <i>BACILLUS SPOROTHERMODURANS</i> STRAINS. NUMBERS REFER TO STRAINS AS MENTIONED IN TABLE 1. MOLECULAR MARKER 100BP (KILOBASE™ DNA MARKER - AMERSHAM BIOSCIENCE) LANE M, 100BP LANE M' AND 1KB (GENERULER™ DNA LADDER - FERMENTAS) LANE M".	41
FIGURE 6A. REP-PCR FINGERPRINTS OF <i>BACILLUS SPOROTHERMODURANS</i> STRAINS. NUMBERS REFER TO STRAINS AS MENTIONED IN TABLE 1. MOLECULAR MARKER 100BP (KILOBASE™ DNA MARKER - AMERSHAM BIOSCIENCE) LANE M, 100BP LANE M' AND 1KB (GENERULER™ DNA LADDER - FERMENTAS) LANE M".	41
FIGURE 6B. REP-PCR FINGERPRINTS OF <i>BACILLUS SPOROTHERMODURANS</i> STRAINS. NUMBERS REFER TO STRAINS AS MENTIONED IN TABLE 1. MOLECULAR MARKER 100BP (KILOBASE™ DNA MARKER - AMERSHAM BIOSCIENCE) LANE M, 100BP LANE M' AND 1KB (GENERULER™ DNA LADDER - FERMENTAS) LANE M".	42
FIGURE 7. RELATIONSHIP AMONGST STRAINS OF <i>B. SPOROTHERMODURANS</i> BASED ON REP-PCR FINGERPRINT ANALYSIS. THE SCALE BAR INDICATES THE PERCENTAGE SIMILARITY AS DETERMINED BY USING THE JACCARD COEFFICIENT.	43

ÍNDICE DE TABELAS

TABLE 1A. <i>BACILLUS</i> SP. STRAINS USED IN THIS STUDY AND THEIR ORIGIN.	35
TABLE 1B. <i>BACILLUS</i> SP. STRAINS USED IN THIS STUDY AND THEIR ORIGIN.....	36
TABLE 2. BOX-, ERIC- AND REP-PCR PRIMERS USED IN THE STUDY.....	36
TABLE 1. BINARY DATA DERIVED FROM BOX-PCR ELECTROPHORETIC BAND PROFILE FOR DIFFERENT CULTURES OF <i>BACILLUS SPOROTHERMODURANS</i>	55
TABLE 2. BINARY DATA DERIVED FROM REP-PCR ELECTROPHORETIC BAND PROFILE FOR DIFFERENT CULTURES OF <i>BACILLUS SPOROTHERMODURANS</i>	56
TABLE 3. BINARY DATA DERIVED FROM ERIC-PCR ELECTROPHORETIC BAND PROFILE FOR DIFFERENT CULTURES OF <i>BACILLUS SPOROTHERMODURANS</i>	57

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

AFLP: *Amplified Fragment Length Polymorphism*

ARDRA: *Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis.*

BHI: *Brain Heart Infusion*

PFGE: *Pulsed Field Gel Eletrophoresis*

RAPD: *Random Amplified Polymorphic DNA*

REA: *Restriction Endonuclease Analysis*

REP-PCR: *Repetitive Extragenic Palindromic Polymerase Chain Reaction*

RFLP: *Restriction Fragment Length Polymorphism*

RT-PCR: *Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction*

UAT: *Ultra Alta Temperatura*

UFC: *Unidade Formadora de Colônia*

UHT: *Ultra High Temperature*

RESUMO

Bactérias aeróbicas mesofílicas formadoras de esporos com alta resistência ao calor foram primeiramente detectadas em leite UHT no sul da Europa em 1985, e denominadas *Bacillus sporothermodurans*, sendo filogeneticamente relacionadas ao grupo do *Bacillus megaterium*. As dificuldades de identificação de *Bacillus sporothermodurans* resultou em um protocolo de PCR desenvolvido por Herman *et al.* (1997), denominado HRS-PCR. A tipagem de isolados desta espécie também é uma necessidade, visando o estudo de rastreamento de contaminações. Há, também, a necessidade de melhor caracterizar geneticamente as linhagens desse microrganismo e obtenção de métodos eficientes de detecção e identificação. Assim, a proposta do presente estudo foi avaliar a viabilidade de uso de rep-PCR na tipagem dos isolados e a diversidade genética das culturas obtidas de *Bacillus sporothermodurans* oriundas de amostras de leite UHT de diferentes locais do Brasil incluindo as regiões sul, sudeste, centro-oeste e nordeste, com o uso de elementos BOX-, ERIC- e REP-PCR. Os resultados demonstram a ampla variação dos padrões de bandejamento dentro dessa espécie. Das 39 linhagens estudadas, 30 linhagens brasileiras demonstraram diferenças significativas entre os padrões de rep-PCR, porém mais relacionadas entre si que linhagens-referência de origem européia. Estes resultados demonstram a elevada heterogeneidade da contaminação do leite UHT no Brasil. Os agrupamentos das culturas demonstram uma fraca correlação entre as linhagens brasileiras e européias, bem como entre os isolados brasileiros obtidos nesse estudo. Portanto, a diferenciação entre os grupos de isolados brasileiros sugere que os problemas de contaminação encontrados no país não estão relacionados a linhagens européias ou com o processamento de amostras de leite em pó de mesma origem no Brasil.

ABSTRACT

Aerobic mesophilic bacteria that form highly heat-resistant spores were first detected in UHT milk in southern Europe in 1985. The new species was named *Bacillus sporothermodurans*, and shown to be phylogenetically related to *Bacillus megaterium*. The identification of *B. sporothermodurans* is problematic, pushing the attempts for rapid and reliable methods for its detection and identification in raw and UHT milk. This need resulted in a PCR protocol, developed by Herman *et al.* (1997), named HRS-PCR. Typing of isolates in this species is also necessary, being useful for tracking the dissemination and contamination of products. The current study aimed at evaluating the genetic diversity of *Bacillus sporothermodurans* isolates originated from UHT milk samples from different regions of Brazil, using BOX-, ERIC- and REP-PCR fingerprinting. Results revealed a wide variation of banding patterns among the studied isolates. From 39 strains tested, 30 Brazilian isolates showed significant differences among rep-PCR patterns. These were more related amongst each other rather the European strains reference. The data demonstrated a high heterogeneity amongst cultures isolated from UHT milk in Brazil. The differentiation of Brazilian and European strains suggests that contamination problems found in Brazil are neither related to European isolates nor to the contamination of Brazilian processing plants by contaminants present in imported powdered-milk.

1 INTRODUÇÃO

Desde 1985, bactérias mesofílicas produtoras de esporos resistentes ao calor, detectadas inicialmente em amostras de leite na Itália e Áustria, vêm constituindo um problema crescente para produtores e processadores, comprometendo a qualidade de produtos lácteos submetidos ao processo UHT – temperatura ultra-elevada (Hammer *et al.*, 1995). Contudo, uma ocorrência massiva de não-esterilidade por um tipo particular de bactéria mesofílica formadora de esporos sugeria que os esporos presentes no leite inicial teriam sobrevivido ao tratamento de esterilização em temperatura ultra-elevada. Embora a bactéria causadora não fosse claramente do gênero *Bacillus*, não era possível caracterizar essa espécie por técnicas convencionais de identificação. Esses microrganismos não eram patogênicos e alcançavam, no máximo, em torno de 10^5UFC.ml^{-1} de leite durante a estocagem a 30°C por 5 dias, não causando deterioração nesse período.

Em 1992, cientistas relataram a ocorrência desses microrganismos em vários países europeus, em níveis semelhantes. Dois anos mais tarde, outros países apresentavam registros de microrganismos termorresistentes em leite UHT. No ano seguinte, um grande número de laticínios produtores de leite longa vida demonstraram contaminação por esporos mesofílicos resistentes ao calor, atingindo, então, aproximadamente 70 países em diferentes continentes,, incluindo Áustria, Espanha, Estados Unidos, França, Itália, e México, entre outros. Atualmente, o problema atinge leiterias de países da América, Ásia e Europa (Pettersson *et al.*, 1996).

O sequenciamento do gene RNAr 16S revelou que o organismo pertencia a uma nova espécie (Klijn *et al.*, 1997). Em 1996, através de técnicas moleculares, uma nova espécie foi descrita e denominada *Bacillus sporothermodurans* (Pettersson *et al.*, 1996). Posteriormente, Herman *et al.* (1997) desenvolveram um método rápido de detecção para este microrganismo, através de uma reação em cadeia da polimerase (PCR), baseado em seqüências específicas de um isolado de leite UHT.

O processo UHT de esterilização instantânea por calor e vácuo, criado por Burton (1969), na Inglaterra, tem por finalidade destruir oito ciclos logarítmicos de carga de esporos no produto processado. A aplicação desse processo no leite é bastante difundida em países de clima quente, nos quais as condições de estoque, transporte e refrigeração podem representar riscos de segurança para a qualidade dos alimentos.

A contaminação de leite UHT por bactérias do grupo *B. sporothermodurans* representa um problema no Brasil e no mundo. Conforme a Norma Mercosul para Leite Longa Vida, o leite UHT não deve conter microrganismos capazes de proliferar em situações normais de armazenamento e distribuição. A Portaria nº. 451 do Ministério da Saúde brasileiro admite uma contagem de no máximo 10^2 UFC/ml no produto. Devido à sua elevada termorresistência, esporos de *B. sporothermodurans* podem acarretar problemas de esterilidade e reprovação de lotes de produção. Segundo a Tetra Pak – World Market Data (1998), o Brasil, em 1996, se encontrava na quinta colocação de mercado mundial no consumo de leite UHT, com um total de 1,783 milhões de litros desse produto produzidos, constituindo 37% do volume mundial, e um consumo per capita anual de 29 litros. As reais dimensões do problema no país ainda não são conhecidas, devido à dificuldade de detecção deste grupo específico de *Bacillus*.

Relativamente poucos dados concernentes à caracterização genotípica e fenotípica desses microrganismos têm sido publicados. Alguns métodos moleculares têm sido utilizados para diferenciar e caracterizar linhagens de *Bacillus sporothermodurans*, incluindo RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), REP-PCR (*Repetitive Extragenic Palindromic Sequences*), ribotipagem e análise da sequência do DNA ribossomal 16S (Guillaume-Gentil *et al.*, 2002).

O presente estudo tem como objetivos a identificação e a caracterização da diversidade genotípica de linhagens de *Bacillus sporothermodurans* isoladas de diferentes regiões produtoras de leite no Brasil, visando se conhecer o espectro de variação genética nos isolados de leite UHT e a distribuição destes diferentes grupos no território nacional. Uma vez inédito no Brasil, estes dados permitirão aumentar-se o

conhecimento acerca do perfil molecular desses microrganismos e auxiliarão no desenho de estratégias de monitoramento e controle microbiano.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Bacillus sporothermodurans* e leite UHT

A bactéria *Bacillus sporothermodurans* foi identificada por Petterson *et al.* (1996) em leite UHT, e apresenta-se como longos bastonetes ($> 30 \mu\text{m}$) Gram-positivos, flagelados, com cerca de $0,7 \mu\text{m}$ de diâmetro, quando cultivada em meio de cultura artificial, e entre $3,4$ a $8,2 \mu\text{m}$, quando isolada primariamente do leite. São aeróbios estritos e formam colônias tênues de 3 mm de diâmetro após cultivo por 2 dias a 37°C em ágar BHI, sendo este o melhor meio de cultura para este microrganismo. Em ágar nutriente, as colônias crescem pobremente e apresentam cor cinza claras, ocasionalmente com centro alaranjado, $1\text{-}2 \text{ mm}$ de diâmetro, circulares, com a superfície levemente enrugada e as bordas onduladas. Possuem uma faixa de temperatura de crescimento entre 20 a 52°C , porém com um melhor desenvolvimento entre 35 e 42°C , em pH $5,7$. Não produzem ácido a partir de açúcares, incluindo celobiose, frutose, galactose, glicose, lactose, manitol, manose, rafinose, salicina e xilose. Produzem enzimas como catalase e protease. Reagem negativamente na reação de Voges-Proskauer e crescem em concentração de 2% NaCl. O nitrato não é reduzido ao nitrito por essa espécie de *Bacillus*. O conteúdo de G + C da linhagem tipo é igual a $36 \text{ mol}\%$ (Petterson *et al.*, 1996). Esse microrganismo pode apresentar endósporos elipsoidais com aproximadamente $1,7 \mu\text{m}$ de comprimento, localizados terminalmente, com uma taxa de esporulação muito baixa ($1:1000$). Linhagens de *B. sporothermodurans* podem ser isoladas de leite UHT, leite esterilizado, creme UHT, leite achocolatado UHT e leite em pó (Petterson *et al.*, 1996).

Ocorre pouca ou nenhuma mudança sensorial do produto processado contaminado com *Bacillus sporothermodurans* durante a estocagem normal, podendo levar o leite à coagulação quando aquecido. Em embalagens com alta permeabilidade ao oxigênio,

podem surgir coagulação e coloração rosada. A contagem máxima encontrada dessa bactéria no produto pode chegar a 10^5 UFC.ml⁻¹ (Hammer *et al.*, 1995).

A identificação de *Bacillus sporothermodurans* não foi inicialmente fácil. Petterson *et al.* (1996) reportam que esse microrganismo hidrolisa a esculina, fracamente a caseína e não hidrolisa arbutina, arginina, amido e uréia em sistemas de ensaio API-BioMerieux. Os resultados destes testes microbiológicos padrão usados na taxonomia de *Bacillus* podem identificar erroneamente essa espécie como *B. aneurinolyticus* e *B. badius*, inclusive morfológicamente. Os *B. sporothermodurans* apresentam filamentos incomuns, quase pleomórficos. A alocação do microrganismo foi dada no grupo do *Bacillus megaterium*. A caracterização fenotípica não se tornou clara, mesmo com os experimentos de Klijn *et al.* (1997), onde as culturas provenientes de leite cru não apresentavam um padrão homogêneo em testes como hidrólise da uréia, caseína e gelatina e redução de nitrato. Montanari *et al.*, (2004) demonstraram que, para *Bacillus sporothermodurans*, não há uma resposta única quanto à fermentação de carboidratos para os 248 isolados estudados, resultando em 5 biotipos principais. Além disso, existem dois tipos morfológicos, de acordo com essa pesquisa, apresentando esporos centrais e subterminais na mesma linhagem.

Reva *et al.* (2001) propuseram uma chave simplificada de identificação para bactérias aeróbias formadoras de esporos, onde o *Bacillus sporothermodurans* aparece indexado no subgrupo III.C.2.ii., utilizando somente dados morfológicos e fisiológicos. A tipagem através de RAPD e ribotipagem confirma os resultados de identificação pela chave.

Para detecção de *B. sporothermodurans* no leite cru, Herman *et al.* (1997) estabeleceram um tratamento térmico de 100°C por 30 minutos, como sendo a relação ideal para maior redução de células vegetativas e ativação dos esporos, uma vez que a microbiota do leite é altamente competitiva com esse microrganismo e, portanto, deve ser eliminada. Klijn *et al.* (1997) registram a dificuldade na detecção dessa bactéria nas amostras de leite pasteurizado e cru, devido à variedade de esporos de *Bacillus* nas amostras.

A primeira descrição de *Bacillus sporothermodurans* não proveniente de leite foi feita por De Silva *et al.* (1998), a partir de silagem, indicando que a contaminação do leite poderia ter esse substrato como fonte, além de haver a possibilidade de possuir outras espécies ainda não-identificadas.

A resistência microbiana ao calor é afetada por vários fatores, tais como temperatura de esporulação, pH e composição do meio de esporulação e tipo de tratamento térmico. Klijn *et al.* (1997) determinaram a resistência dos esporos de *B. sporothermodurans*, confirmando sua excepcional resistência a 140 °C. Essas bactérias esporuladas têm uma enorme resistência à temperatura do processamento UHT e apresentam padrão cinético diferente daquele dos esporos de *B. stearothermophilus*. Os valores D_{140} de 3,4 a 7,9 segundos demonstram isso, enquanto que o *B. stearothermophilus* apresenta $D_{140} = 0,9$ segundos. As curvas de tempo de morte térmica (TDT) mostram diferentes inclinações para os esporos de *B. sporothermodurans* e *B. stearothermophilus* com $z = 13,1$ a $14,2^{\circ}\text{C}$ e $9,1^{\circ}\text{C}$, respectivamente (Huemmer *et al.*, 1998). Não há observações com respeito a outros esporos aeróbios na literatura com índices tão elevados. A causa dessa extrema resistência ainda não está esclarecida. Estes dados são essenciais para auxiliar a prática leiteira na solução dos problemas em relação à sobrevivência dos esporos no processo UHT.

Com o objetivo de avaliar possíveis problemas ao consumidor de leite UHT contendo *Bacillus sporothermodurans*, foi determinada a patogenicidade de 15 linhagens mesofílicas formadoras de esporos altamente resistentes ao calor. As culturas foram avaliadas quanto à citotoxicidade e atividade enzimática. Em modelo animal, foi avaliada a patogenicidade em embriões de galinha, efeitos teratogênicos, retardamento do crescimento e peso relativo dos embriões. Esses parâmetros foram avaliados estatisticamente e nenhuma diferença significativa entre ovos inoculados e não-inoculados foram observados, concluindo serem todas as linhagens não-patogênicas (Hammer & Walte, 1996). A patogenicidade e citotoxicidade em ratos foi avaliada por Petterson *et al.* (1996), que não evidenciaram qualquer expressão patogênica ou produção de toxinas de relevância por esses microrganismos.

2.2 Processamento de leite por Ultra Alta Temperatura (UAT)

O processamento do leite com altas temperaturas pode ser feito de diferentes formas, incluindo a autoclavagem (115 a 120°C, por 15 a 20 min, ou 109 a 115°C, por 20 a 40 min) e o tratamento UAT, também conhecido como UHT (*Ultra High Temperature*), resultando em um produto que pode ser estocado sem refrigeração por alguns meses. No processamento UHT, o produto é submetido à temperatura num intervalo de 135°C a 142°C em poucos segundos, resultando na destruição de todas as células vegetativas e da maioria dos esporos de microrganismos presentes no alimento cru, sendo utilizado especialmente para alimentos líquidos (Pettersen *et al.*, 1996).

Segundo a Portaria n. 146 de 07 de março de 1996 do Ministério da Agricultura e Reforma Agrária, o leite UAT é o leite homogeneizado submetido à temperatura de 130 a 150°C por 2 a 4 segundos, mediante processo térmico de fluxo contínuo, imediatamente resfriado à temperatura inferior a 32°C e envasado sob condições assépticas em embalagens esterilizadas e hermeticamente fechadas.

Os produtos lácteos esterilizados e UHT são considerados comercialmente estéreis quando, após incubação por 15 dias a 30°C, a contagem total microbiana é inferior ou igual a 10 UFC/0,1 ml (Herman *et al.*, 1997).

A contaminação microbiana pode ser detectada pelo controle de qualidade do produto, principalmente quando parâmetros como potencial redox ou ATP são usados para monitorar o crescimento bacteriano. Quando a esterilidade é checada somente pelo controle do pH ou microcalorimetria, o desenvolvimento de microrganismos que atingem baixas populações e que não afetam o pH do leite, pode não ser detectado (Klijn *et al.*, 1997).

Endósporos de *B. sporothermodurans* podem sobreviver ao tratamento UHT, sendo encontrados no produto final, podendo germinar e crescer no alimento estocado. Pesquisas desde a década de 60 já tentavam melhorar a qualidade do leite, estudando a inativação térmica de esporos bacterianos do gênero *Bacillus* resistentes ao processamento UHT em leite (Segner *et al.*, 1963; Busta, 1967; Franklin, 1970; Martin,

1974; Mostert *et al.*, 1979; Westhoff & Dougherty, 1981). Forschino *et al.* (1990) e Kessler *et al.* (1994) também detectaram problemas de não-esterilidade em produtos UHT que parecia ser causada por esporos bacterianos ultra-resistentes ao calor pertencentes ao gênero *Bacillus*. Coelho *et al.* (2001) demonstraram, ao analisar amostras brasileiras de leite UAT integral da região de Belo Horizonte, que os microrganismos mais encontrados eram do gênero *Bacillus*.

Dependendo do tipo de injeção de calor aplicado ao produto (direta ou indireta) no processo de esterilização e do tipo de embalagem, a deterioração de leite UHT por *Bacillus sporothermodurans* pode ser observada por uma leve alteração na cor (rosa), *off-flavour* e alterações de propriedades físico-químicas no produto (Klijn *et al.*, 1997).

2.3 Detecção e identificação de bacilos por PCR específico

Métodos de detecção e identificação baseados em ácidos nucleicos, tais como o PCR e sondas moleculares, são ferramentas promissoras para identificação e caracterização de microrganismos em amostras de alimentos. A caracterização precisa de microrganismos em nível de espécie e linhagem tornou-se altamente importante, especialmente para os grupos que necessitam de monitoramento constante na indústria de alimentos. Vários aprimoramentos metodológicos em biologia molecular têm sido desenvolvidos para se diminuir o tempo gasto nas análises e evitar, em muitos casos, ambigüidade na identificação dos organismos-alvo.

Devido à sua importância na indústria de alimentos e ambiente, uma grande variedade de métodos moleculares foi desenvolvida para detecção e identificação de bacilos e grupos relacionados. Um grande número destes estudos foi desenvolvido com base nos genes ribossomais, principalmente o DNAr 16S, e região espaçadora DNAr 16S-23S (De Silva *et al.*, 1998).

Para identificar *Bacillus* spp. recuperado de raízes, micorrizas e rizosfera de coníferas, Petersen *et al.* (1995) desenvolveram *primers* para a região do DNAr 23S, desenhados para hibridar exclusivamente com DNA de *B. polymyxa* e/ou *B. mycoides*.

Damgaard *et al.* (1996), com o objetivo de diferenciar linhagens de *B. cereus* e *B. thuringiensis* de uma variedade de outras bactérias, criaram *primers* para o gene PI-PLC, onde verificaram alta especificidade para a detecção em ambiente complexo, como o solo.

Sabendo da grande proximidade entre os gêneros *Bacillus* e *Paenibacillus*, Shida *et al.* (1997) analisaram a posição taxonômica de algumas espécies de *Bacillus* dentro da família *Bacillaceae*. O uso de *primers* específicos, desenhados para diferenciar o gênero *Paenibacillus*, mostraram que seis espécies de *Bacillus* apresentavam amplificação positiva do fragmento do gene para o RNAr 16S específico das linhagens do gênero *Paenibacillus*. Baseado nessas observações e em outras características taxonômicas, seis espécies de *Bacillus* foram transferidas para o gênero *Paenibacillus*. Rice (1999) desenvolveu um método rápido baseado em PCR para detecção do gene *vip3A*, que codifica uma proteína inseticida em bacilos entomopatogênicos com um amplo espectro contra lepidópteros. As combinações de *primers* específicos foram capazes de gerar fragmentos diagnósticos que predizem com sucesso a presença desse gene em várias linhagens de *Bacillus thuringiensis*.

A detecção de *Alicyclobacillus acidoterrestris* é essencial para o controle de qualidade de várias bebidas industrializadas. O uso da RT-PCR (transcrição reversa seguida pela reação em cadeia pela polimerase), após um curto enriquecimento da cultura, foi usado para identificar essa bactéria em sucos. Dois oligonucleotídeos específicos foram selecionados para a região V2 e V4 do gene que codifica para o RNAr 16S, proporcionando rápida identificação das linhagens (Yamazaki *et al.*, 1996).

Na tentativa de uma identificação acurada desses bacilos, Herman *et al.* (1997) desenvolveram um método de detecção por PCR com *primers* específicos. A sequência parcial do gene DNAr 16S apresenta diferenças comparada a grupos de *Bacillus* sp. filogeneticamente relacionados. Em 1998, De Silva *et al.* desenvolveram uma sonda de hibridação para detecção e identificação do *B. sporothermodurans*, baseada na região espaçadora entre os genes RNAr 16S e 23S. Em complementação, Scheldeman *et al.* (2002) estudaram um novo método de PCR com dois *primers* específicos para o gene rRNA 16S de *B. sporothermodurans*. A metodologia foi validada usando uma variedade

de isolados de diferentes fontes e uma coleção de *Bacillus* spp., lácteos ou não, além de outras taxa relevantes. Em ambos trabalhos foi possível identificar linhagens provenientes de leite UHT ou leite tratado termicamente sem ser submetido às provas bioquímicas.

Outros genes se mostraram pouco informativos para fins de diferenciação de espécies dentro do grupo *Bacillus*. Oligonucleotídeos específicos para o gene *gyrB* foram sintetizados na tentativa de discriminar *Bacillus cereus* de *Bacillus thuringiensis*, entretanto, não foi possível diferenciar estas espécies numa grande coleção de *Bacillus* sp. (Chen & Tsen, 2002).

2.4 Tipagem genômica de bactérias por PCR de elementos repetitivos

Os genomas procarióticos contêm uma variedade de seqüências repetitivas de baixo número de cópias, tais como elementos de inserção, *operons* de RNAr, genes de RNAt, entre outros. Tais elementos têm sido isolados de bactéria Gram negativas e positivas de diferentes gêneros (Versalovic *et al.*, 1994). Versalovic *et al.* (1991) descreveram um método para *fingerprinting* de genomas bacterianos através do exame dos padrões específicos obtidos por PCR de elementos de DNA repetitivo presentes nos genomas bacterianos denominado rep-PCR. Várias famílias de seqüências repetitivas estão distribuídas no genoma de diversas espécies bacterianas. A análise de rep-PCR foi estudada com mais detalhes baseada na ocorrência de seqüências específicas repetitivas conservadas, como as seqüências palindrômicas extragênicas repetitivas (REP), seqüências consensos intergênicas repetitivas enterobacterianas (ERIC) e elementos BOX – que estão distribuídas nos genomas de diversas bactérias. Uma ordem complexa de 10 a até pouco mais de 30 fragmentos amplificados por PCR é produzida por genoma, variando em tamanho de menos de 200 pares de bases até mais de 6 kb. Estas seqüências parecem estar localizadas em posições intergênicas distintas e presentes em ambas as orientações no cromossomo, tendo os *primers* sido desenhados para ler “*outward*” (acima) a partir de repetições invertidas em REP e ERIC e a partir da subunidade boxA do BOX (Versalovic *et al.*, 1994). O uso desses *primers*, no método

de reação em cadeia da polimerase, leva a amplificação de regiões distintas do genoma localizadas entre as ocorrências de REP, ERIC e BOX (de Bruijn *et al.*, 1996). Essa técnica tem sido muito usada para identificar espécies, diferenciar linhagens e avaliar a diversidade genética microbiana com implicações na microbiologia clínica e ambiental (Louws *et al.*, 1999). Olive & Bean (1999) afirmaram que, enquanto as seqüências REP e ERIC eram mais utilizadas como alvos para tipagem de DNA, os elementos BOX eram preferidos para diferenciar *Streptococcus pneumoniae*. Hoje, esses elementos são comumente encontrados em outros microrganismos.

O rep-PCR pode ser feito com DNA extraído de colônias bacterianas ou por um método modificado, utilizando células não processadas. Essa técnica tem sido amplamente empregada para diferenciar linhagens de *Bartonella*, *Bacillus subtilis*, *Burkholderia cepacia*, *Citrobacter diversus*, *Enterobacter aerogenes*, *Helicobacter pylori*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Rhizobium melioli*, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina e *Streptococcus pneumoniae*. Além dessas, encontramos o uso dessa técnica em bactérias fitopatogênicas, principalmente do gênero *Xanthomonas* e também, mais recentemente, em *Lactobacillus* sp., *Bacillus* sp., *Paenibacillus* sp. e *Pseudomonas* sp. (Olive & Bean, 1999).

Essa técnica pode ser aplicada a qualquer número de isolados e tem poder discriminatório consideravelmente melhor do que análise de restrição do gene DNAr 16S ou da região espaçadora 16S-23S (Vila *et al.*, 1996 e Appuhamy *et al.*, 1997). Além disso, estudos comparando rep-PCR com outros métodos de tipagem, como eletroforese multilocos de enzimas, caracterização bioquímica e ribotipagem, mostram que a resolução de rep-PCR é superior a esses métodos. O rep-PCR apresenta uma boa correlação com os resultados obtidos por PFGE, porém, em geral, com um poder discriminatório ligeiramente inferior (Olive & Bean, 1999).

2.4.1 Seqüências palindrômicas extragênicas repetitivas (REP)-PCR

A seqüência repetitiva primeiro descrita e mais intensamente estudada é o palíndromo extragênico repetitivo (REP), ou seqüência de unidade palindrômica (PU), inicialmente identificada nas enterobactérias *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*

através de comparação da sequência de DNA de regiões intercistrônicas de diferentes *operons* (Gilson *et al.*, 1984). Os elementos REP são sequências com 38 pares de bases, consistindo de seis posições degeneradas e uma alça variável entre cada lado de um ramo palindrômico conservado. Estima-se que existam em torno de 500 a 1000 cópias de sequências REP organizadas em *clusters* no cromossomo da *Escherichia coli* (Stern *et al.*, 1984). Os elementos REP parecem estar localizados dentro ou no final de um *operon*, em diferentes orientações e intercalados, sendo distribuídos em todo o genoma de *Escherichia coli* (Lupski & Weinstock, 1992).

Em alguns casos, o elemento REP está presente na mesma região intergênica de *operons* análogos de diferentes espécies bacterianas. Através da utilização de hibridação DNA-DNA e PCR, sequências do tipo REP foram documentadas em 7 de 10 filos definidos por Woese (1987, 1992) com base na análise das sequências DNAr 16S (Lupski & Weinstock, 1992).

Várias funções têm sido propostas para esses elementos, incluindo a terminação da transcrição, estabilidade do RNAr e a organização do domínio cromossomal *in vivo* (Versalovic *et al.*, 1991). Os elementos REP não estão sempre presentes nas mesmas regiões intergênicas em diferentes espécies indicando que eles não são essenciais no mecanismo da expressão gênica. Contudo, quando presentes, podem influenciar a quantidade ou a regulação da expressão de um gene ou *operon*. Também tem sido mostrado que a sequência REP liga-se à DNA girase e DNA polimerase I, e que uma proteína estimula a ligação da girase à sequência REP. Estes estudos propõem que essas sequências estejam envolvidas na dobradura do nucleóide bacteriano em domínios de alças independentes superenrolados (Lupski & Weinstock, 1992).

2.4.2 Sequências consenso intergênicas repetitivas enterobacterianas (ERIC)

Os elementos ERIC têm sido extensivamente utilizados com sucesso para tipagem de bactérias. Também foram chamados de IRU (*Intergenic Repeat Unit*). São sequências de 126 pb, que contêm uma região central repetida e invertida, sendo localizadas em pontos extragênicos do genoma (regiões não transcritas do cromossomo), em regiões

intergênicas de *operons* policistrônicos ou ainda em regiões não-transcritas *upstream* (acima) ou *downstream* (abaixo) de open reading frames - ORFs - (regiões potencialmente codificantes) (Sechi *et al.*, 1998). Eles foram definidos baseados primariamente na seqüência de dados obtidos a partir de *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium* (Hulton *et al.*, 1991). Elementos repetitivos tipo ERIC têm sido demonstrados em todas as eubactérias e sua localização no cromossomo variam em diferentes espécies distintas (Lupski & Weinstock, 1992).

2.4.3 Elementos BOX

Os elementos BOX foram os primeiros elementos repetitivos interdispensos encontrados numa bactéria Gram positiva (*Streptococcus pneumoniae*) e estão localizados em regiões intergênicas, podendo formar estruturas *stem-loop* devido à sua simetria palindrômica (Olive & Bean, 1999). O genoma desse microrganismo contém 25 repetições dessas seqüências BOX. Eles são elementos modulares repetidos compostos de várias combinações de três seqüências de subunidades referidas como boxA, boxB e boxC com, respectivamente, 57, 43 e 50 nucleotídeos. A maioria desses elementos está nas imediações dos genes implicados no processo de transformação genética ou virulência de *S. pneumoniae*. Esta localização sugere uma possibilidade de que sejam elementos regulatórios (Martin *et al.*, 1992). Os elementos BOX não têm seqüências relacionadas aos elementos REP e ERIC (Martin *et al.*, 1992).

Em 1994, Versalovic *et al.* relataram que por meio de sondas de oligonucleotídeos complementares a essas subunidades, somente a subunidade boxA parece ser altamente conservada entre diversas bactérias.

2.4.4 rep-PCR

Os *primers* combinados de REP, ERIC e BOX têm sido extensivamente aplicados para tipagem molecular de bactérias proporcionando uma discriminação acurada entre linhagens de diversas espécies bacterianas.

De Bruijn (1992) examinou genomas de bactérias Gram negativas isoladas de solo usando *primers* correspondentes às seqüências de REP e ERIC. Estas análises aplicadas aos isolados de *Rhizobium meliloti* revelaram uma excelente correlação entre os dados filogenéticos gerados por MLEE (eletroforese multilocos de enzimas) e os dados obtidos por REP e ERIC-PCR sugerindo que essas técnicas moleculares são úteis para identificação e classificação de bactérias.

Vários estudos são descritos em torno de bactérias simbióticas e patogênicas às plantas. *Primers* de rep-PCR mostram-se bastante presentes em linhagens de *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas campestris* e, *Xanthomonas oryzae*, gerando diferentes padrões genômicos das linhagens dentro de cada espécie (Louws *et al.*, 1994, 1995). A seleção para um determinado grupo de bactérias parece afetar a distribuição das seqüências repetitivas, resultando em perfis únicos para linhagens ou patovares específicos. Nesse caso, os padrões genômicos gerados por rep-PCR podem ser explorados no diagnóstico e diferenciação de linhas evolucionárias em torno de um patovar. A descoberta da diversidade populacional de cada patovar tem implicações na implementação de programas de melhoramento, estratégias de gerenciamento de doenças e estudos epidemiológicos e ecológicos. Num trabalho em 1995, os mesmos autores confirmam a importância do rep-PCR aplicado em bactérias patogênicas associadas a plantas, permitindo discriminar e agrupar esses microrganismos e selecionar linhagens representativas para estudos de fitopatologia e ecologia microbiana. Pooler *et al.* (1996), analisando 25 isolados de *Xanthomonas fragariae* de diferentes regiões geográficas, afirmaram que as estimativas de similaridade genômica baseadas nos dados de RAPD estão de acordo com os perfis obtidos por REP e ERIC-PCR que dividem as linhagens patogênicas em grupos genotípicos similares. Na mesma época, Opgenorth *et al.* (1996) reafirmaram que os padrões de bandas gerados por REP e ERIC-PCR são muito similares para as linhagens patogênicas dessa mesma espécie na Califórnia (USA) e, ainda, com a vantagem de não haver falso positivos na identificação das bactérias por REP ou ERIC-PCR, como verificado pelo método de I-ELISA. Com o propósito de estudar mais de 400 linhagens de *Xanthomonas* spp. em 32 pontos da América Central e Caribe, Bouzar *et al.* (1999) fizeram análises fenotípicas e *fingerprinting* genômico. Os autores mostraram uma alta correlação entre os resultados

dos agrupamentos formados por rep-PCR e os testes bioquímicos aplicados, além dos dois grandes grupos relativamente homogêneos formados sugerirem que há uma taxa superior de migração de genótipos do Caribe para a América Central.

Extensivos estudos, utilizando como modelo o gênero *Xanthomonas*, foram realizados para comparar análises geradas por rep-PCR e AFLP com dados experimentais de hibridação de DNA (Rademaker *et al.*, 2000; Vauterin *et al.*, 2000). Observou-se uma alta correlação entre os três métodos confirmando que o rep-PCR corresponde precisamente aos clusters identificados por homologia DNA-DNA. As técnicas de *fingerprinting* genômico realmente demonstraram as relações genéticas entre os microrganismos e, portanto, os autores sugeriram que o rep-PCR seja usado, devido ao seu alto poder discriminatório, para determinar diversidade genômica de populações bacterianas. Ainda no gênero *Xanthomonas*, Lopes *et al.* (2001), usando *primers* para as seqüências BOX e ERIC, conseguiram separar *Xanthomonas albilineans* de outras espécies de bactérias associadas a cana-de-açúcar e determinar a distribuição de culturas de diferentes países, investigando a heterogeneidade da população.

Os rizóbios são fenotipicamente bem caracterizados por sua habilidade de induzir a formação de nódulos e fixação de nitrogênio em leguminosas. A diversidade genotípica e a filogenia de nove linhagens isoladas dos nódulos de diferentes plantas das Ilhas Canárias foi estudada por Vinuesa *et al.* (1998). Os padrões de rep-PCR tiveram um poder de discriminação muito maior que a sorotipagem, permitindo a determinação das relações filogenéticas de isolados fenotipicamente idênticos de *Bradyrhizobium* sp. em três sorogrupos. Trabalho semelhante foi desenvolvido em 2001 por Gao *et al.*, com 95 culturas de diferentes regiões geográficas da China isoladas dos nódulos de *Astragalus adsurgens*, onde REP, ERIC e BOX-PCR contribuíram enormemente para a distinção de espécies e linhagens. Estudando culturas de *Paenibacillus polymyxa* isoladas da rizosfera de quatro cultivares de milho do cerrado brasileiro, da Mota *et al.* (2002) encontraram um alto nível de polimorfismo genético utilizando a combinação de dados gerados por RAPD e BOX-PCR. Os resultados sugerem que os cultivares de milho afetam significativamente as populações desse microrganismo.

Pelo fato de algumas linhagens de *Bacillus sphaericus* serem patogênicas a larvas de mosquitos, existe um grande interesse no estudo da diversidade genética e desenvolvimento de métodos rápidos de identificação dessas bactérias para aplicação nos programas de controle biológico, principalmente no Brasil. Da Silva *et al.* (1999) usaram duas sondas em experimentos de hibridação, *primers* de REP e BOX-PCR para obtenção dos *fingerprintings*, testes fenotípicos como resistência a antibióticos, metais pesados e compostos orgânicos, em isolados brasileiros. Seus experimentos mostraram que o rep-PCR foi crucial na diferenciação de linhagens de alta toxicidade e na seleção de isolados com potencial no controle biológico das larvas. Miteva *et al.* (1999) compararam os resultados das técnicas RAPD e rep-PCR em linhagens representativas dos 5 grupos de *Bacillus sphaericus* mostrando que as respostas para ambas as técnicas foram muito similares. Os agrupamentos confirmaram resultados anteriores obtidos por ribotipagem, demonstrando o alto nível de confiabilidade dos métodos de tipagem molecular. Isso é de grande importância para a rápida identificação de novos isolados, patogênicos ou não para os mosquitos, evitando testes de patogenicidade que consomem muito tempo, evitando a realização de testes de patogenicidade desnecessários.

A epidemiologia molecular de *Ornithobacterium rhinotracheale*, um patógeno que causa infecções em perus e outras aves, com prejuízos substanciais nesse setor da economia norte-americana, foi avaliada numa pesquisa a técnica rep-PCR, juntamente com outras análises de tipagem (Amonsin *et al.*, 1997). O índice de discriminação (*D*) para rep-PCR foi superior (*D* = 0,55) ao MLEE (*D* = 0,26) para os 55 isolados bacterianos analisados.

A microbiologia clínica, entre outros pontos importantes, procura identificar rapidamente linhagens patogênicas com importância na saúde pública e com implicações terapêuticas. Sechi *et al.* (1998) demonstraram que as seqüências ERIC podem ser usadas para estabelecer relações clonais entre diferentes culturas de *Mycobacterium tuberculosis*, mesmo quando esses clones mostram padrões idênticos nos *fingerprintings* para a seqüência de inserção IS6110. Estes resultados foram confirmados por ribotipagem e PCR-GTG (uso do oligonucleotídeo (GTG)₅ – um marcador repetitivo do cromossomo de *Mycobacterium tuberculosis*).

Porphyromonas gingivalis é considerada um agente etiológico importante na periodontite. Contudo, sua presença nem sempre está associada à doença e as linhagens diferem no grau de virulência. Comparando as técnicas RAPD, ribotipagem, REA e REP-PCR, este último mostrou-se rápido e de excelente poder discriminatório, principalmente quando combinado com um desses métodos. Entre outras vantagens, a ribotipagem e o REA consomem mais tempo e são mais caros que o REP-PCR, e o RAPD necessita ser otimizado através da análise de vários *primers* (Teanpaisan & Douglas, 1999). Van der Zee *et al.* (1999) fizeram genotipagem molecular de uma coleção bem definida de *Staphylococcus aureus* confirmando as comparações dos resultados do estudo anterior, porém incluindo análises de gel de eletroforese em campo pulsado.

Gómez-de-leon *et al.* (2000) testaram somente ERIC-PCR para estabelecer diferenças entre linhagens virulentas e não-virulentas de *Haemophilus influenzae* como causa de doenças em humanos. Os resultados mostraram que esse método é uma ferramenta poderosa para a distinção de isolados de *H. influenzae* potencialmente patogênicos, o que faz com que os autores estimulassem seu uso para investigações em epidemiologia molecular.

Algumas espécies de estafilococos são encontradas freqüentemente como agentes infecciosos de diversas doenças em humanos. Devido ao potencial patogênico desses microrganismos, há a necessidade de métodos efetivos para identificação de linhagens clinicamente importantes. Atualmente, os métodos rápidos utilizados podem causar falhas, enquanto que os mais acurados como sorotipagem, ribotipagem, análise do gene DNAr 16S e hibridização DNA-DNA são muito laboriosos para testes de rotina laboratorial. Por isso, Wieser & Busse (2000) aplicaram a técnica rep-PCR numa coleção de linhagens do gênero *Staphylococcus* e concluíram que a combinação de ERIC e BOX-PCR é excelente para a identificação de isolados de *Staphylococcus epidermidis*. Brumlik *et al.* (2001) também conseguiram através de REP-PCR identificar *Bacillus anthracis* a partir de uma extensa variedade de *Bacillus* sp..

Outro gênero de significância clínica é o *Brevibacterium*, cuja similaridade morfológica e fisiológica é alta junto a outros gêneros microbianos. Alves *et al.* (2002),

em seus experimentos, concluíram que quando se utiliza ARDRA, o poder de diferenciação restringe-se a gênero e espécie. Entretanto, os perfis dos padrões genômicos são altamente discriminatórios com rep-PCR e ribotipagem em nível infraespecífico.

Uma avaliação de técnicas de tipagem molecular para *Pseudomonas* sp. mostrou que as técnicas de ERIC e BOX-PCR quando analisadas em conjunto são mais discriminatórias que RFLP e ribotipagem (Dawson *et al.*, 2002).

Os critérios morfológicos e fisiológicos são amplamente utilizados para identificação de espécies de *Bacillus* comumente encontradas em alimentos. Guinebretiere *et al.* (2001), sabendo que até 44% dos isolados bacterianos de purês de batata não conseguem ser identificados pelo sistema API50CHB, sugeriram o uso do REP-PCR como uma estratégia preliminar de reduzir o número de identificações convencionais.

As bactérias lácticas são de grande importância econômica na indústria láctea e para a produção de alimentos fermentados e suplementos. Gevers *et al.* (2001) demonstraram que dentre as técnicas REP-PCR, BOX-PCR e (GTG)₅-PCR, somente a última é potencialmente promissora para tipagem de lactobacilos e outras bactérias lácticas em alimentos. Berthier *et al.* (2001), com o objetivo de descrever a diversidade de lactobacilos em queijo Comte, fizeram uso de rep-PCR (ERIC-PCR e BOX-PCR) e PCR específico para espécie, obtendo sucesso para os isolados mesofílicos sem ambigüidades ou discrepâncias entre os resultados dos dois métodos evitando o uso de testes fenotípicos. Outro estudo investigou com sucesso as características genotípicas de linhagens de lactobacilos termofílicos homofermentativos selecionados e selvagens durante a maturação de queijos Comté usando RAPD, REP-PCR e PFGE para identificar essas culturas “starters” (Bouton *et al.*, 2002).

Klijn *et al.* (1997), comparando linhagens de *Bacillus sporothermodurans* isoladas de leite cru e UHT, concluíram que a aplicação de RAPD e REP-PCR foi extremamente útil na discriminação dos isolados obtidos a partir do leite cru, sugerindo trabalhos que envolvam um número maior de linhagens. No ano seguinte, Herman *et al.*, com o objetivo de discriminar linhagens do mesmo microrganismo, corroboraram com esses

resultados usando uma coleção de 85 culturas isoladas de várias regiões e unidades de produção na Europa, somente com a análise dos padrões de REP-PCR.

Em 2000, Herman & Heyndrickx localizaram elementos REP-like no microrganismo *Bacillus sporothermodurans* e consideraram essas seqüências suficientes para tipagem por REP-PCR sendo esta a primeira menção da presença desses elementos em um microrganismo Gram positivo. A localização intragênica dessas seqüências se contrapõe a localização intergênica dos elementos REP típicos em *Enterobacteriaceae*.

Para estudar as relações genéticas entre linhagens de *Bacillus sporothermodurans* isolados da Ásia, América do Sul e Europa de diversas fontes, Guillaume-Gentil *et al.* (2002) submeteram o DNA desses microrganismos a ribotipagem e REP-PCR, o que possibilitou aos autores afirmar a heterogeneidade genética existente na espécie mesmo entre isolados de um mesmo país. Também ficou estabelecido a precocidade da seleção de atributos para a descrição da espécie a partir de isolados somente de leite UHT onde há uma certa homogeneidade, havendo a necessidade de adequação para as características observadas a partir de culturas de fontes ambientais, entre outras.

Os relatos apresentados demonstram claramente a sensibilidade e elevado poder discriminatório dos métodos de tipagem baseados em rep-PCR. No Brasil, não existem dados dessa natureza que permitam compreender a presença predominante de *Bacillus sporothermodurans* como o microrganismo esporogênico capaz de ultrapassar as barreiras do tratamento UHT em leite fluido e outros lácteos.

3 OBJETIVOS

O presente trabalho visa o estudo de linhagens de *Bacillus sporothermodurans* isoladas de leite UHT proveniente de diferentes locais de produção e processamento do Brasil, com os seguintes objetivos:

- identificar microrganismos contaminantes isolados de leite UHT como *Bacillus sporothermodurans*, através de PCR com *primers* específicos para o grupo;
- caracterizar a diversidade genotípica de linhagens isoladas de diferentes regiões produtoras e processadoras no país, visando conhecer a distribuição dos diferentes grupos de isolados no território nacional;
- estruturar uma coleção de pesquisa de referência para o grupo, com organismos isolados no Brasil e linhagens referências originárias da Europa, as quais estarão disponíveis para realização de estudos futuros de interesse acadêmico e para ensaios na indústria.

4 ARTIGO

ISOLATION, IDENTIFICATION AND DIVERSITY OF *BACILLUS SPOROTHERMODURANS* STRAINS ISOLATED FROM UHT FLUID MILK IN BRAZIL EVALUATED BY REP-PCR TYPING

Cleber Rabelo da Roza^{1,2}, Valéria Maia de Oliveira², F. Fantinatti-Garboggini² & Gilson Paulo Manfio²

¹Laboratório de Biologia Molecular, Centro de Ciências da Saúde, UNISINOS, CEP 93022-000, São Leopoldo (RS) Brazil; ²Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA), UNICAMP, CP 6171, CEP 13081-970, Campinas (SP), Brazil.

To be submitted to: Systematic and Applied Microbiology

Corresponding author: Cleber Rabelo da Roza, Laboratório de Biologia Molecular, Centro de Ciências da Saúde, UNISINOS, CEP 93022-000, São Leopoldo (RS) Brazil, Phone: +55 (51) 5903333, e-mail: cleber@bios.unisinos.br.

4.1 Abstract

Bacteria that differentiate into highly heat-resistant endospores (HHRS strains) may survive ultrahigh-temperature treatment of milk and germinate in the final product. Mesophilic aerobic sporeformers with extremely high heat resistance were first detected in ultrahigh temperature UHT-treated milk from southern Europe in 1985. They do not noticeably spoil the milk and are nonpathogenic. *Bacillus sporothermodurans* is a mesophilic Gram-positive bacterium that can form highly heat resistant endospores, surviving the pasteurization process commonly used for the production of UHT milk and other milk-products. The occurrence of these bacteria in milk has been reported in several European, Asiatic and American countries. Data from previous studies demonstrated that a diverse range of *B. sporothermodurans* strains can be found as contaminants in processed milk within a region, providing potential information for determining origin of the strains and selecting prevalent genotypes for the development of improved industrial processes. The objectives were to identify *Bacillus sporothermodurans* strains from UHT milk by specific *primers* characterizing genetically European and Brazilian isolates by molecular typing techniques (rep-PCR), and create a reference culture collection to others studies. Samples of UHT milk collected from different Brazilian states were plated on brain heart infusion (BHI) agar media to isolate *Bacillus sporothermodurans* strains selectively. All 39 isolates found were subjected to PCR with specific primers for *Bacillus sporothermodurans* (HRS-PCR). Primers used were HRS1 and HRS2. *Bacillus sporothermodurans* TP1248 strain was used as positive control while *Bacillus coagulans* (CCT 0199, CCT 2467 and CCT 4825 strains) and *Bacillus stearothermophilus* strain CCT 0515 strain were used as negative controls. The results showed efficiency of HRS-PCR primers for the identification of the *Bacillus sporothermodurans* strains when all strains studied were compared with atypical reference strain. In the current study, a large the isolates recovered from UHT milk in Brazil were analyzed in order to investigate the diversity of *B. sporothermodurans* in comparison with data available from Europe. Data obtained

herein corroborated with previous studies, indicating a large number of isolates involved in the contamination of UHT milk in Brazil. Moreover, all cultures were deposited into microorganisms collection (CBMAI) to others researchers or food industries. This study represents the first report about the diversity of *B. sporothermodurans* from a tropical country.

4.2 Introduction

Heat treatment is commonly applied to increase the shelf life of foods, such as ultrahigh temperature (UHT) processing used as commercial sterilization. Bacteriological spoilage, depending on the intensity of the heat treatment, may be delayed or prevented completely. UHT processing can provide prolonged shelf life without refrigeration to milk. The UHT process temperature range is 135 to 142°C for a few seconds, which should result in the destruction of any vegetative cells and endospores present in the raw material. Problems regarding to the sterility of UHT-milk have been reported (Forshino *et al.*, 1990; Kessler *et al.*, 1994). Exceptionally heat-resistant endospores survive the UHT process, they can pass into the final product, germinate and grow in the milk stored (Hammer *et al.*, 1995). The total count in product packages never exceeded a maximum of 10^5 cfu.ml⁻¹ (Scheldeman *et al.*, 2002). In addition, the spores do not affect the pH, stability and sensory quality of the milk and rarely cause any characteristic spoilage (Scheldeman *et al.*, 2002). Huemer *et al.* (1998) found D values at 140°C that varied between 3.4 and 7.9 s and z values that varied between 13.1 and 14.2°C for spore preparations from the original stock culture and a significant decrease in the heat resistance after multiple laboratory culturing. Recently, this new species has been described by Petterson *et al.* (1996) as *Bacillus sporothermodurans*.

Bacillus sporothermodurans is a mesophilic Gram-positive bacterium which can differentiate into highly heat resistant endospores (Petterson *et al.*, 1996; Klijn *et al.*, 1997), surviving the pasteurization process commonly used for the production of UHT

milk. The occurrence of these bacteria in thermal-processed milk and milk products has been reported in several countries in Europe, Asia and the Americas, representing a huge economical loss and a problem for the international market as a whole. The identification of these microorganisms using phenotypic tests is time-consuming and may be ambiguous since strains grow poorly on laboratory media (De Silva *et al.*, 1998).

Apart from the ribosomal intergenic spacer region being a frequently used target for identification and typing, the use of species-specific fragments on the 16S rRNA gene has also been reported for identification of Gram-positive bacilli by means of PCR primers or probes (Scheldeman *et al.* 2002). Herman *et al.* (1997) developed a rapid and sensitive polymerase chain reaction (PCR) detection method in raw milk for this organism based on specific sequences (rDNA 16S) of a UHT-treated milk isolate derived from subtractive hybridization, named HRS-PCR. Several cultures originated from farm reacted negatively in the HRS-PCR by Herman *et al.* (1997). However, these strains were assigned to a *Bacillus sporothermodurans* by a molecular method and/or a new 16S rDNA-based specific PCR identification test (Scheldeman *et al.*, 2002).

A large number of molecular typing techniques have been used successfully to discriminate and characterize *Bacillus sporothermodurans* strains, including PCR-based methods such as random amplified polymorphic DNA analysis (RAPD), repetitive extragenic palindromic (REP-PCR), ribotyping and 16S rDNA sequence analysis (Guillaume-Gentil *et al.*, 2002). All techniques showed that the different *Bacillus sporothermodurans* strains isolated so far from European UHT-treated sterilized milk are phylogenetically very closely related, forming the so-called HRS clone (Hammer *et al.*, 1995). Recently, some strains have also been isolated from raw milk and other sources like animal feed, garden and domestic wastes composts (De Silva *et al.*, 1998; Scheldeman *et al.*, 2002; Vaerewijck *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2002). Combined REP, ERIC e BOX primers have been extensively applied to bacteria molecular typing method providing a accurate discrimination between strains of many bacterial species.

In Brazil, since 1997, some UHT milk packing showed high level of contaminants (Associação Brasileira de Longa Vida - ABLV) detected by Serviço de Inspeção Federal of Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Many Brazilian dairies present hygiene

lack serious problem increasing microbial population in the raw milk. It's important to identify quickly the presence of *Bacillus sporothermodurans* to prevent contamination of processing plants using milk to other purpose.

The objectives of the present study were to isolate, to identify strains from UHT-treated milk of different Brazilian states by using HRS-PCR with primers HRS1 and HRS2 and to evaluate the diversity of isolates by rep-PCR associated to the contamination problem in Brazil comparing it with data from bacterial populations from Europe.

4.3 Material and Methods

Isolation of bacterial strains and culture conditions. Samples of skim and whole UHT milk from several regions from Brazil (Table 1) were analyzed regarding microbiological quality. Packages were intact, ready to consume, without problems in relation commercial standards and valid period. Isolates were obtained by spreading 100 µl of product on brain heart infusion (BHI; Oxoid, Basingstoke, UK) supplemented with bacteriological agar (15 g.L⁻¹; Oxoid) (pH 6.8). All strains were cultivated at 37°C for 24 or 48 h. Single colonies were streaked on slants and stored until further analysis. Sub-culturing was avoided as much as possible. Stock cultures were maintained at -80°C in BHI medium containing 20% glycerol.

Reference cultures. The bacterial reference strains used as control for the PCR detection and rep-PCR experiments were *Bacillus coagulans* CCT 0199^T (Coleção de Culturas Tropical, Fundação André Tosello, Campinas, SP, Brazil), CCT 2467^T and CCT 4825; *Bacillus sporothermodurans* CBMAI 0159^T (Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria, CPQBA/UNICAMP, Campinas, SP, Brazil; =MB 582, NIZO, Netherlands Institute for Dairy Research, Ede, Netherlands; =TP 1248, Petterson et al., 1996), and *Bacillus stearothermophilus* CCT 0515^T.

DNA preparation. Genome DNA template for PCR amplification was extracted from pure cultures by the method described by Pitcher *et al.* (1989) modified. Aliquots from liquid cultures (1.5 ml) were centrifuged (12,000 rpm for 3 min) and washed 2 times with 1 ml of ultrapure (Milli-Q) water. The pellet was gently macerated against the wall of the tube by adding an equal amount of glassbeads with the help of small plastic mortar. The cells were resuspended in 100 µl TE buffer pH 8.0 (Sambrook *et al.*, 1989) containing lysozyme (2 mg.ml⁻¹) and incubated for 1 h at 37°C. Lysis and DNA purification were carried out as described previously by Pitcher *et al.* (1989). DNA concentration purified in TE buffer pH 8.0 was estimated by comparison with standard λ phage DNA on agarose gels under UV light. DNA was stored -80°C for subsequent analysis.

Identification of presumptive *B. sporothermodurans* isolates. HRS-PCR was performed in a final volume of 50 µl containing 20 ng of genomic DNA, 5 µl of 10X PCR buffer (Amersham Bioscience), 10 mmol L⁻¹ MgCl₂, 0.2 mmol.l⁻¹ of each deoxynucleoside triphosphate (Amersham Bioscience), 2 U Taq DNA polymerase (Amersham Bioscience), and 1 µM of primers HRS1 (5'-GGAAGACCACTGTCGTGG-3') and HRS2 (5'-CTTAACCTAAAATAAGG-3'). The mixture was subjected to 30 cycles of amplification in a thermal cycler Gene Amp 2400 PCR System (Perkin Elmer). The first cycle was preceded by an initial denaturation step of 5 min at 95°C; each cycle consisted of denaturation of 1 min at 95°C, annealing step of 1 min at 42°C and an extension step of 2 min at 72°C. The last cycle was followed by a final extension of 10 min at 72°C. Amplification products (8 µl) were separated by electrophoresis on 1.5% agarose gels containing 0.1 µg.ml⁻¹ ethidium bromide in 1X TAE (Tris acetate-EDTA) buffer (Sambrook *et al.*, 1989). The fingerprint patterns obtained were registered by using the Stratagene Eagle Eye II Still Video System (Stratagene's National Service Center, Texas, USA).

Genetic fingerprinting. 100 ng of genomic DNA were used in 25 µl reactions containing 0.5 U *Taq* DNA polymerase (Amersham Bioscience), 1X *Taq* buffer, 0.75

mM dNTP mix, 2.0 μ M each primer and 2.5 mM $MgCl_2$. PCR amplifications were carried out in a Gene Amp 2400 PCR System (Perkin Elmer). The amplification programs varied according to the primer sets used (Table 2). For the ERIC-PCR reactions were used primers from literature (Table 2) and an initial denaturation step at 95 °C for 7 min, followed by 30 cycles of 1 min at 94 °C, 1 min at 52 °C and 8 min at 65 °C, and a final extension at 65 °C for 16 min. For the REP-PCR reactions were conducted using primers described in Table 2, and denaturation cycle at 95 °C for 6 min, followed by 30 cycles of 1 min at 94 °C, 1 min at 40 °C and 8 min at 65 °C, and a final extension at 65 °C for 16 min. For the BOX-PCR reactions, the primer used was described in Table 2, and PCR conditions comprised 95 °C for 7 min as an initial denaturation step, 30 cycles of 1 min at 94 °C, 1 min at 53 °C and 8 min at 56 °C, and a final extension at 65 °C for 16 min. Amplifications products (8 μ l) were separated by electrophoresis on 1.5% agarose gels containing 0.1 μ g.ml⁻¹ ethidium bromide in 1X TAE (Tris acetate-EDTA; Sambrook *et al.*, 1989). The fingerprint patterns obtained were analyzed by using the GelCompar software package v.4.1 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). Band scoring was accomplished manually followed by computer-assisted analysis of the data. In these cases, the highest level of reproducibility has been accomplished by loading representative strains in the same gel and scoring each band as present (1) or (0) at each position along the lane. Similarity matrices were calculated using Jaccard's coefficient available in software package NTSYS-pc (Exeter Biological Software, Setauket, NY), using a data matrix constructed from the combination of all three fingerprints (BOX-, ERIC- and REP-PCR).

Deposit of isolates in Culture Collection. Some cultures of *Bacillus sporothermodurans* from UHT milk used in this study were kept in the Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria (CPMAI), CPQBA/UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brazil and others in the Coleção de Culturas Tropical (CCT), Fundação André Tosello, Campinas, São Paulo, Brazil.

4.4 Results and Discussion

A collection of 39 *Bacillus sporothermodurans* strains isolated from UHT milk samples originated from production units at different states in Brazil were submitted to specific PCR identification (Table 1). All colonies analyzed presented morphological features similar to those of *Bacillus sporothermodurans* described in the literature (Montanari *et al.*, 2004). All bacterial cultures were isolated with similar morphological aspect but impossible to identify by common biochemical proofs to *Bacillus* sp. and other microorganisms (Montanari *et al.*, 2004).

All isolates reacted positively with HRS1 and HRS2 primers described by Herman *et al.* (1997), showing that UHT-treated milk packages contained *Bacillus sporothermodurans* strains (Figures 1, 2, 3). The PCR amplification products should comprise two bands, of 350 and 180 base pairs, for *Bacillus sporothermodurans* DNA and no similar amplification for other bacilli (Fergus Priest, personal communication). Scheldeman *et al.* (2002) related that the HRS-PCR is more discriminatory for the *Bacillus sporothermodurans* strains which are relevant for UHT-treated products than for farm isolates of this species (raw milk, feed concentrate, silage). All cultures tested by those authors showed a high 16S rRNA gene sequence similarity and a high DNA-DNA relatedness with the type strain of *Bacillus sporothermodurans*. The results obtained in this report confirm the discriminatory power of the HRS-PCR protocol here described.

All strains isolated as contaminants from UHT milk in Brazil studied in the current investigation were *Bacillus sporothermodurans*. These data indicate that the contamination of UHT milk products by *B. sporothermodurans* may occur in milk produced and processed in several plants in different regions of the country. These results emphasize the need for further studies to be conducted in order to determine the potential environmental sources of this bacterium and similarities in the industrial processes used that may contribute for the problem.

All 39 Brazilian strains identified by *Bacillus sporothermodurans* by specific primer PCR method (HRS-PCR, Hermann *et al.*, 1997; Scheldeman *et al.*, 2002) were successfully typed by BOX-, ERIC- and REP-PCR (Figures 4, 5 and 6, respectively). The approach used yielded complex genomic fingerprints with intense bands in the size range between 150 bp and 4000 bp, allowing visual comparison between the strains.

BOX-PCR patterns demonstrated a high genotypic homogeneity using BOXAIR primers in these cultures. All strains presented a typical band at ca. 800 bp (Figure 4). In addition, two others conserved bands were found at ca. 950 and 1050 bp, except for CBMAI 0123, CBMAI 0135, CBMAI 0136 and CBMAI 0149. CBMAI 0117 exhibited just the 800 bp band.

Using ERIC-PCR, all *Bacillus sporothermodurans* strains displayed the major polymorphism indicating great genetic diversity and lower similarity level (Figure 5). Third-six strains studied produced a conserved band at ca. 1000 bp, except for CBMAI 0119, CBMAI 0137 and CBMAI 0149. This is in accordance with Lima *et al.* (2002) in the identification of new isolates of *Bacillus thuringiensis* using rep-products and comparing REP- and ERIC-PCR sequences pattern.

The REP-pattern indicated intermediate genotypic variation in our analysis (Figure 6). All isolated produced a typical pattern consisting of one conserved fragment at ca. 950 bp and some produced smaller bands. REP-PCR allows rapid fingerprinting at the infra-specific level, without reducing the discriminatory power (Guinebretiere *et al.*, 2001).

UHT type strain CBMAI 0159 (=MB 582, =TP1248) formed a distinct rep-PCR group. This result is in agreement with the previous finding of Petterson *et al.* (1996) and Guillaume-Gentil *et al.* (2002), who described this strain as “atypical” based upon ribotyping analysis. Hermann *et al.* (1998) proposed REP-PCR as a very powerful tool for typing *Bacillus* spp., showing, for the first time, that individual *Bacillus sporothermodurans* strains could be discriminated. These authors also report that strain CBMAI 0159 was aberrant, and could not be discriminated by this molecular method. Strain CBMAI 0159 could not be discriminated by pyrolysis mass spectrometry, ribotyping or RAPD (Klijn *et al.*, 1997).

A dendrogram generated using the unweighted pair-group with arithmetic averages (UPGMA) method using the appended combination of REP-PCR, ERIC-PCR and BOX-PCR genomic fingerprints (binary data are presented in table 1, 2 and 3 - Anexos) is shown in Figure 7. This yielded six major clusters, defined at a similarity level of 85.0% and thirteen clusters (I to XIII) at the level of 93.28%.

The dendrogram in Figure 7 obtained reflects the overall classification of isolates recovered from contaminated milk samples in Brazil. Some strains presented similarity level of 100%, representing identical cultures. Thus, thirty Brazilian strains demonstrated high genetic heterogeneity.

Type of UHT milk, period of packing and UHT treatment do not seem to influence in the distribution of the cultures in the dendrogram clusters.

CBMAI 0153 and 0118 cultures were very similar. It seems to be possible because both came from Alagoas and B manufacturer. CBMAI 0125 and CBMAI 0132 strains showed that are the same strain originated from the same Brazilian State (Goiás) and brand (C). CBMAI 0122, 0126 and 0124 cultures had equal genotypic patterns as well as CBMAI 0130 and 0131 also. All those isolates were from same Brazilian state and previous supplier. Two other strains that showed total similarity amongst the banding patterns were CBMAI 0142 and 0144, both from Rio Grande do Sul, however from different brands. It suggests that may have been a milk supplier in common or contamination by the usage of powdered milk from the same origin in the UHT process.

CBMAI 0140, 0141, 0143, 0145 also can be considered identical based on rep-PCR fingerprint analysis. However, CBMAI 0141 and 0145 are from the same region (RS) and brand (F), which could suggest the same justification considered for the strains CBMAI 0142 e 0144. Nevertheless, the CBMAI 0140 and 0143 proceed from Goiás and São Paulo. This difference must be due the common fact that some UHT milk processing companies from the State of São Paulo collecting huge amounts of milk produced in the State of Goiás.

Even though the Bahia's brand I also has as supplier the States of Pernambuco, São Paulo, Minas Gerais and Goiás, the banding patterns of the two cultures from this brand do not have similarity superior of 85.0%, with none of the strains from the

mentioned States and neither close to each other, which makes possible to affirm that the two analyzed cultures must not proceed from crossed contamination with the studied States.

Strains from Italy (CBMAI 0156) and Germany (CBMAI 0157) were closely related very close to the isolate from Belgium (CBMAI 0158). CBMAI 0159 (France) has a little more than 40% similarity with the others, confirming its divergent background, also shown in other studies. This bacteria group originated from other continent revealed itself phylogenetically distant from all the Brazilian strains, which allows us to affirm that the hypothesis of contamination of the Brazilian UHT milk by European strains is quite unlikely.

4.5 Acknowledgments

C.R.R. was supported by grants from UNISINOS (Universidade do Vale do Rio dos Sinos, Brazil) and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil).

4.6 References

de Bruijn F.J., Scheider M., Rossbach U. & Louws F.J. (1997). Automated fluorescent and conventional Rep-PCR genomic fingerprinting and multiplex PCR to classify bacteria and track genes. *Progres in Microbial Ecology*. (Martins, M.T. *et al.*, Eds). Brazilian Society for Microbiology.

De Silva S., Petterson B., De Muro M.A. & Priest F.G. (1998). A DNA probe for the detection and identification of *Bacillus sporothermodurans* using the 16S-23S rDNA spacer region and phylogenetic analysis of some field isolates of *Bacillus* which form highly heat resistant spores. *Systematic Applied Microbiology*. **21**, 398-407.

Forschino R., Gaill A. & Ottogalli G. (1990). Research on the microflora of UHT milk. *Annali di Microbiologia ed Enzymologia*. **40**, 47-59.

Guillaume-Gentil O, Scheldeman P., Marugg J., Herman L, Joosten H. & Heyndrickx M. (2002). Genetic heterogeneity in *Bacillus sporothermodurans* as demonstrated by ribotyping and repetitive extragenic palindromic-PCR fingerprinting. *Applied Environmental Microbiology*. **68**, 4216-4224.

Guinebretiere, M.H., Berge, O., Normand, P., Morris, C., Carlin, F. & Nguyen-the. (2001). Identification of bacteria in pasteurized zucchini purées stored at different temperatures and comparison with those found in other pasteurized vegetable purées. *Applied and Environmental Microbiology*. **67**, 4520-4530.

Hammer P., Lembke F., Suhren G. & Heeschen W. (1995). Characterization of a heat resistant mesophilic *Bacillus* species affecting quality of UHT-milk – a preliminary report. *Kiel Milchwirtschaft Forschungsber*. **47**, 303-311.

Herman L., Vaerewijck M.J.M., Moermans R.J.B. & Waes G.M.A.V.J. (1997). Identification and detection of *Bacillus sporothermodurans* spores in 1, 10, and 100 mililitres of raw milk by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. **63**, 3139-3143.

Herman L., Heyndrickx M. & Waes G. (1998). Typing of *Bacillus sporothermodurans* and other *Bacillus* species isolated from milk by repetitive element sequence based PCR. *Letters in Applied Microbiology*. **26**, 183-188.

Huemer I., Klijn N., Vogelsang H. & Langeveld L. (1998). Thermal death kinetics of spores of *Bacillus sporothermodurans* isolated from UHT-milk. *International Dairy Journal*. **8**, 851-855..

Kessler H. G., Pfeifer, J. & Schwöppe C. (1994). Untersuchungen über hitze resistente mesophile *Bacillus*-Sporen in UHT-Milch. *Deutsche Milchwirtschaft*. **13**, 588-592.

Klijn N., Herman L., Langeveld L., Vaerewijck M., Wagendorp A.A., Huemer I. & Weerkamp A.H. (1997). Genotypical and phenotypical characterization of *Bacillus sporothermodurans* strains, surviving UHT sterilization. *International Dairy Journal*. **7**,421-428.

Lima, A.S.G., Guidelli, A.M., Abreu, I.L. & Lemos, M.V.F. (2002). Identification of new isolates of *Bacillus thuringiensis* using rep-PCR products and δ -endotoxin electron microscopy. *Genetics and Molecular Biology*. **25**, **2**, 225-229.

Montanari, G., Borsari, A., Chiavari, C., Ferri, G., Zambonelli, C. & Grazia, L. (2004). Morphological and phenotypical characterization of *Bacillus sporothermodurans*. *Journal of Applied Microbiology*. **97**, 802-809.

Petterson B., Lembke F., Hammer P., Stackebrandt E. & Priest, F. (1996). *Bacillus sporothermodurans*, a new species producing highly heat-resistant endospores. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **46**, 759-764.

Pitcher, D.G., Saunders, N.A. & Owen, R.J. (1989). Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Letters in Applied Microbiology*, **8**, 151-156.

Sambrook J., Fritsch E.F. & Maniatis T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.

Scheldeman P., Herman L., Goris J., de Vos P. & Heyndrickx M. (2002). Polymerase chain reaction identification of *Bacillus sporothermodurans* from dairy sources. *Journal of Applied Microbiology*. **92**,983-991.

Vaerewijck M.J.M., de Vos P., Lebbe L., Scheldeman P., Hoste B. & Heyndrickx M. (2001). Occurrence of *Bacillus sporothermodurans* and other aerobic spore-forming species in feed concentrate for dairy cattle. *Journal Applied Microbiology*. **91**, 1074-1084.

Versalovic J., Koeuth, T. & Lupski, J. (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*, **24**, 6823-6831.

Zhang Y.C., Ronimus, R.S., Turner, N., Zhang, Y. & Morgan, H.W. (2002). Enumeration of thermophilic *Bacillus* species in composts and identification with a random amplification polymorphic DNA (RAPD) protocol. *Systematic and Applied Microbiology*. **25**, 618-626.

Table 1a. *Bacillus* sp. strains used in this study and their origin.

Strain code	Code at CBMAI culture collection*	Origin**	Type of UHT milk	Milk manufacturer [§]	Period of Packing	UHT Treatment
1	CBMAI 0159 ^T	France	Whole milk	ND	ND	ND
2	CCT 0199 ^T	ND	Evaporated milk	ND	ND	ND
3	CCT 2467 ^T	ND	Evaporated milk	ND	ND	ND
4	CCT 4825	ND	Cocoa powder	ND	ND	ND
5	CCT 0515 ^T	ND	Steam sterilization control	ND	ND	ND
6	CBMAI 0117	Brazil / RS	Whole milk	E	Nov/99	Indirect
7	CBMAI 0118	Brazil / AL	Whole milk	B	Jan/00	Indirect
8	CBMAI 0119	Brazil / AL	Whole milk	B	Jan/00	Indirect
9	CBMAI 0120	Brazil / AL	Whole milk	B	Jan/00	Indirect
10	CBMAI 0121	Brazil / GO	Whole milk	C	Feb/00	Indirect
11	CBMAI 0122	Brazil / GO	Whole milk	C	Feb/00	Indirect
12	CBMAI 0123	Brazil / GO	Whole milk	C	Feb/00	Indirect
13	CBMAI 0124	Brazil / GO	Whole milk	C	Feb/00	Indirect
14	CBMAI 0125	Brazil / GO	Whole milk	C	Feb/00	Indirect
15	CBMAI 0126	Brazil / GO	Whole milk	C	Feb/00	Indirect
16	CBMAI 0127	Brazil / GO	Whole milk	C	Feb/00	Indirect
17	CBMAI 0128	Brazil / GO	Whole milk	C	Feb/00	Indirect
18	CBMAI 0129	Brazil / GO	Whole milk	C	Feb/00	Indirect
19	CBMAI 0130	Brazil / GO	Whole milk	C	Feb/00	Indirect
20	CBMAI 0131	Brazil / GO	Whole milk	C	Feb/00	Indirect
21	CBMAI 0132	Brazil / GO	Whole milk	C	Feb/00	Indirect
22	CBMAI 0133	Brazil / MG	Skim milk	D	Dec/99	Indirect
23	CBMAI 0134	Brazil / MG	Skim milk	D	Jan/00	Indirect
24	CBMAI 0135	Brazil / MG	Skim milk	D	Jan/00	Indirect
25	CBMAI 0136	Brazil / MG	Skim milk	D	Feb/00	Indirect
26	CBMAI 0137	Brazil / RS	Whole milk	E	Dec/99	Indirect
27	CBMAI 0138	Brazil / RS	Whole milk	E	ND	Indirect
28	CBMAI 0139	Brazil / GO	Whole milk	C	Jan/00	Indirect

*CBMAI = Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria, CPQBA/UNICAMP, Campinas, SP, Brazil (<http://www.cpqba.unicamp.br/cbmai>) – CCT = Coleção de Culturas Tropical, Fundação André Tosello, Campinas, SP (<http://www.fat.org.br>). **Brazilian states (AL-Alagoas; BA-Bahia; CE-Ceará; GO-Goiás; MG-Minas Gerais; SP-São Paulo; RS-Rio Grande do Sul). [§]Codes correspond to eight national milk suppliers in the country.

[†]NIZO = Netherlands Institute for Dairy Research, Ede, Netherlands.

Table 1b. Continued.

Strain code	Code at CBMAI culture collection*	Origin**	Type of UHT milk	Milk manufacturer [§]	Period of Packing	UHT Treatment
29	CBMAI 0140	Brazil / GO	Whole milk	C	Jan/00	Indirect
30	CBMAI 0141	Brazil / RS	Whole milk	F	Jan/00	Indirect
31	CBMAI 0142	Brazil / RS	Whole milk	F	Jan/00	Indirect
32	CBMAI 0143	Brazil / SP	Whole milk	G	Mar/00	Indirect
33	CBMAI 0144	Brazil / RS	Whole milk	E	Dec/99	Indirect
34	CBMAI 0145	Brazil / RS	Whole milk	F	ND	Indirect
35	CBMAI 0146	Brazil / MG	Skim milk	D	ND	Indirect
36	CBMAI 0147	Brazil / GO	Whole milk	C	ND	Indirect
37	CBMAI 0148	Brazil / SP	Whole milk	A	ND	Indirect
38	CBMAI 0149	Brazil / RS	Whole milk	H	Apr/00	Indirect
39	CBMAI 0150	Brazil / BA	Skim milk	I	Apr/00	Indirect
40	CBMAI 0151	Brazil / AL	Whole milk	B	Apr/00	Indirect
41	CBMAI 0152	Brazil / BA	Whole milk	I	Apr/00	Indirect
42	CBMAI 0153	Brazil / AL	Whole milk	B	Jan/00	Indirect
43	CBMAI 0154	Brazil / CE	Whole milk	J	Aug/00	Direct
44	CBMAI 0155	Brazil / RS	Whole milk	H	Oct/00	Indirect
45	CBMAI 0156	Italy (=MB 338, NIZO) ⁺	Whole milk	ND	ND	ND
46	CBMAI 0157	Germany (= MB 372, NIZO)	Whole milk	ND	ND	ND
47	CBMAI 0158	Belgium (=MB 512, NIZO)	Whole milk	ND	ND	ND

*CBMAI = Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria, CPQBA/UNICAMP, Campinas, SP, Brazil (<http://www.cpqba.unicamp.br/cbmai>) – CCT = Coleção de Culturas Tropical, Fundação André Tosello, Campinas, SP (<http://www.fat.org.br>). **Brazilian states (AL-Alagoas; BA-Bahia; CE-Ceará; GO-Goiás; MG-Minas Gerais; SP-São Paulo; RS-Rio Grande do Sul). [§]Codes correspond to eight national milk suppliers in the country. ⁺NIZO = Netherlands Institute for Dairy Research, Ede, Netherlands.

Table 2. BOX-, ERIC- and REP-PCR primers used in the study.

Primer	Sequence	Reference
ERIC1R	5' –ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC–3'	Versalovic <i>et al.</i> , 1991
ERIC2	5' –AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG–3'	Versalovic <i>et al.</i> , 1991
REP2-I	5' –ICGICTTATCIGGCCTAC–3'	Versalovic <i>et al.</i> , 1991
REP1R-I	5' –IIIIICGICGICATCIGGC–3'	Versalovic <i>et al.</i> , 1991
BOXA1R	5' –CTACGGCAAGGCGACGCTGACG–3'	de Bruijn, 1992

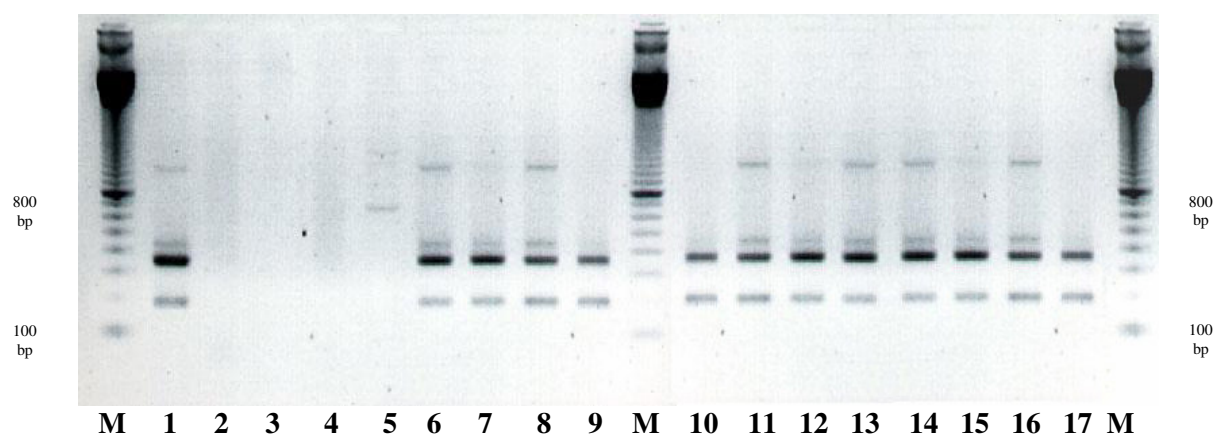


Figure 1. HRS-PCR using specific primers for *Bacillus sporothermodurans*. Numbers refer to strains listed in Table 1. M = Molecular marker 100 bp (Amersham Bioscience).

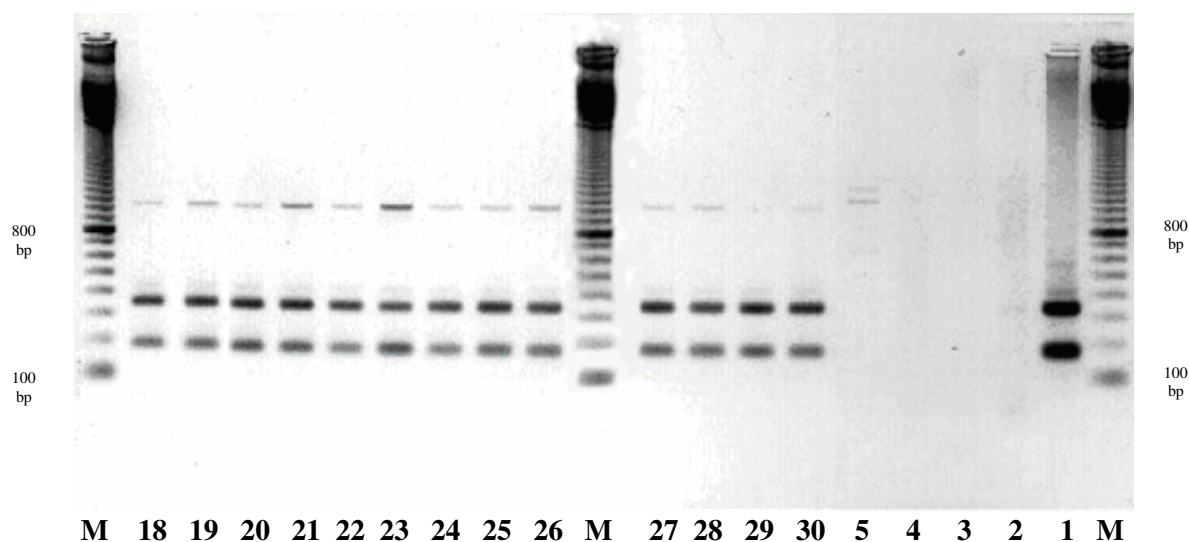


Figure 2. HRS-PCR using specific primers for *Bacillus sporothermodurans*. Numbers refer to strains listed in Table 1. M = Molecular marker 100 bp (Amersham Bioscience).

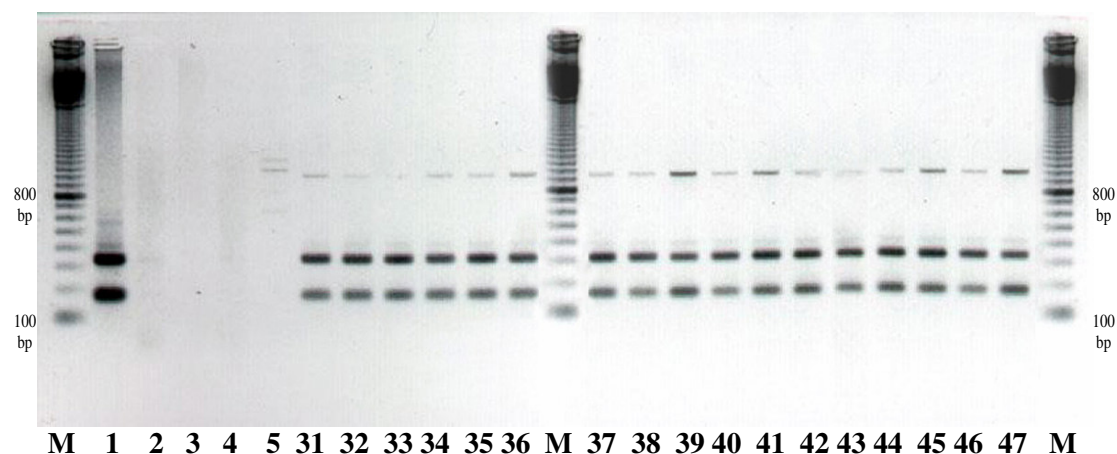


Figure 3. HRS-PCR using specific primers for *Bacillus sporothermodurans*. Numbers refer to strains listed in Table 1. M = Molecular marker 100 bp (Amersham Bioscience).

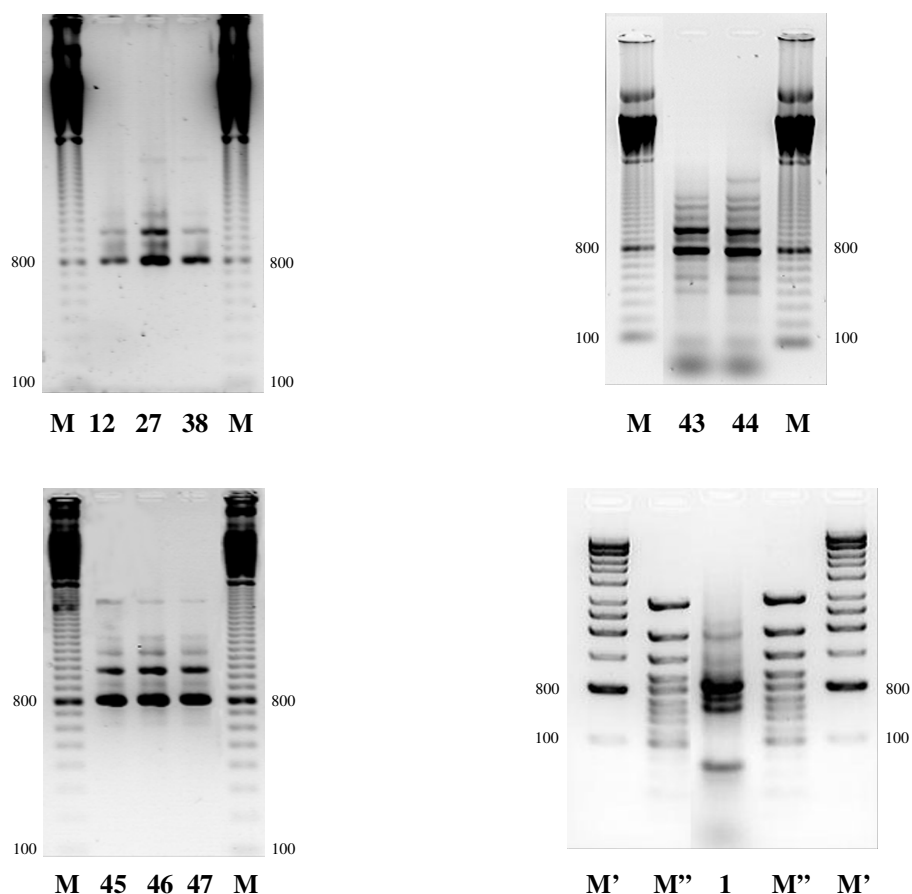


Figure 4a. BOX-PCR fingerprints of *Bacillus sporothermodurans* strains. Numbers refer to strains as mentioned in Table 1. Molecular marker 100bp (KiloBase™ DNA Marker - Amersham Bioscience) lane M, 100bp lane M' and 1kb (GeneRuler™ DNA Ladder - Fermentas) lane M''.

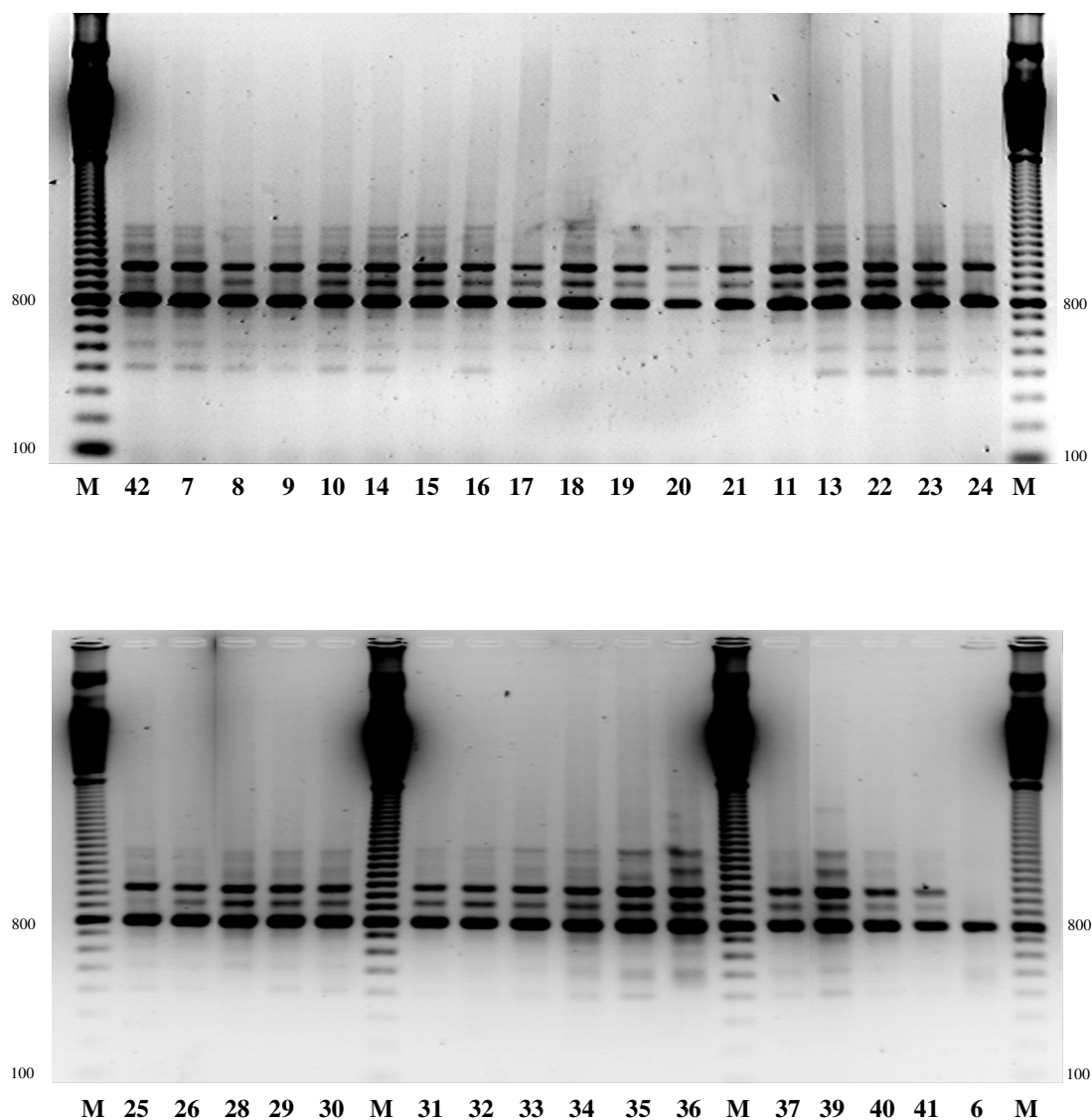


Figure 4b. BOX-PCR fingerprints of *Bacillus sporothermodurans* strains. Numbers refer to strains as mentioned in Table 1. Molecular marker 100bp (KiloBaseTM DNA Marker - Amersham Bioscience) lane M, 100bp lane M' and 1kb (GeneRulerTM DNA Ladder - Fermentas) lane M''.

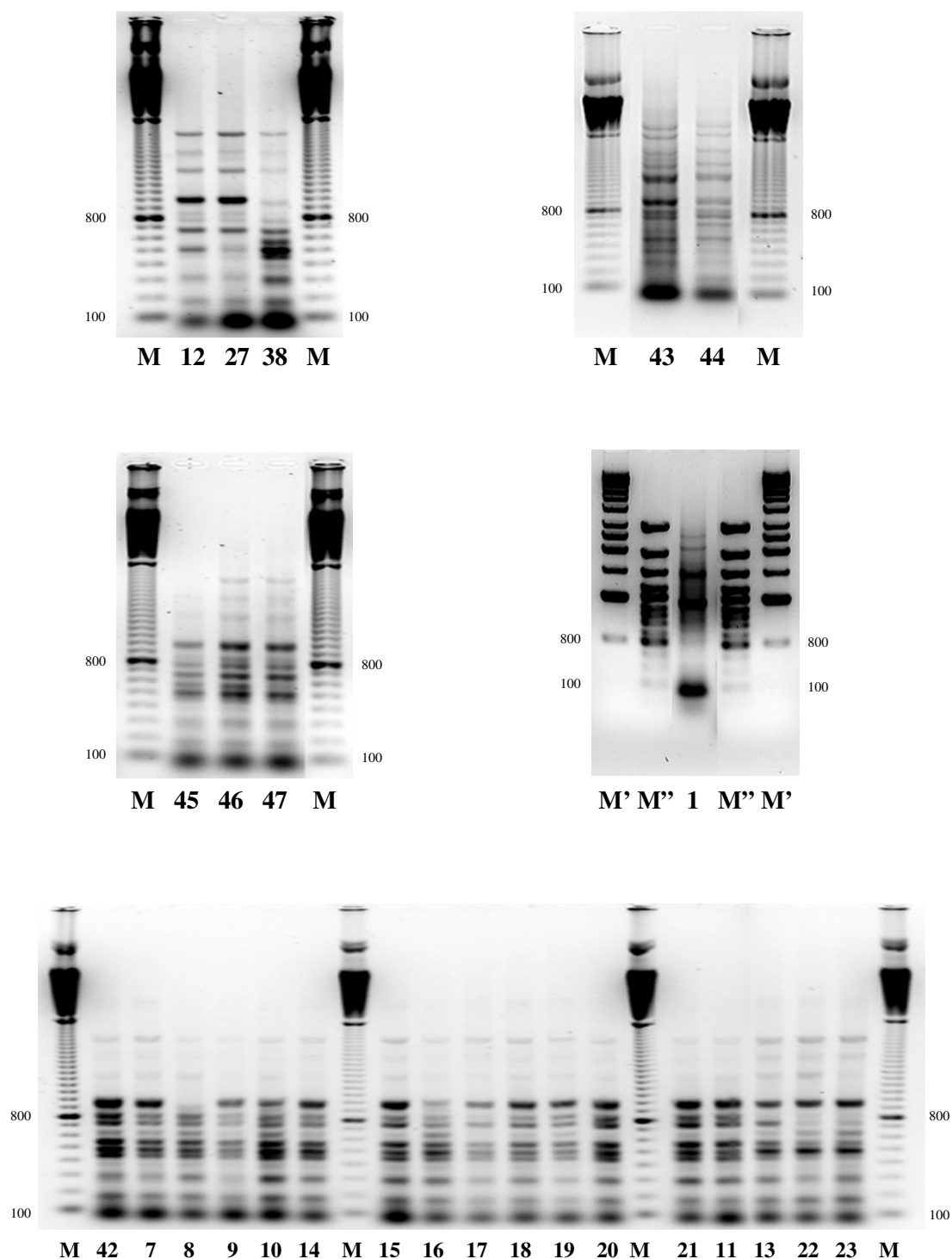


Figure 5a. ERIC-PCR fingerprints of *Bacillus sporothermodurans* strains. Numbers refer to strains as mentioned in Table 1. Molecular marker 100bp (KiloBaseTM DNA Marker - Amersham Bioscience) lane M, 100bp lane M' and 1kb (GeneRulerTM DNA Ladder - Fermentas) lane M''.

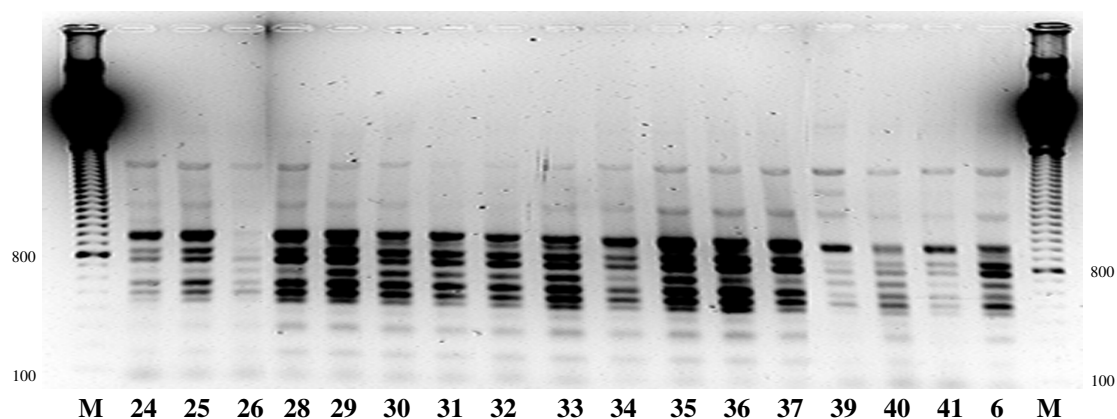


Figure 5b. ERIC-PCR fingerprints of *Bacillus sporothermodurans* strains. Numbers refer to strains as mentioned in Table 1. Molecular marker 100bp (KiloBase™ DNA Marker - Amersham Bioscience) lane M, 100bp lane M' and 1kb (GeneRuler™ DNA Ladder - Fermentas) lane M''.

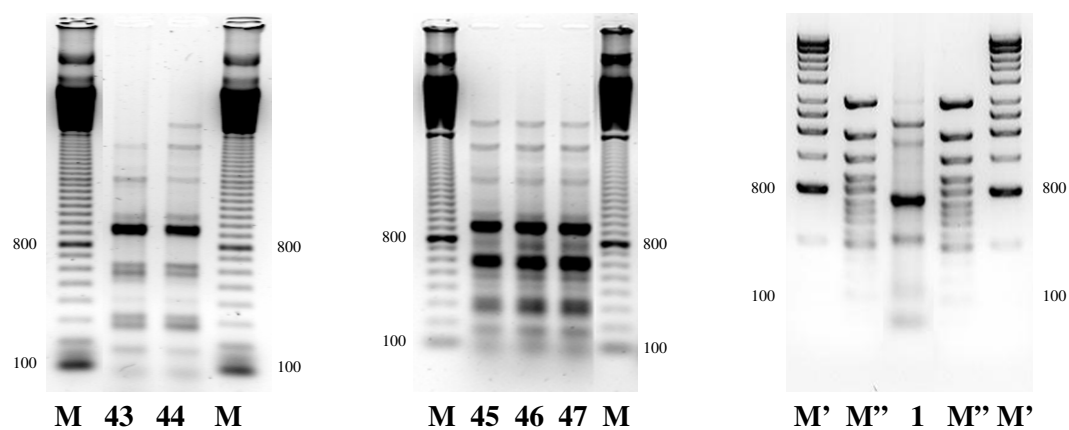


Figure 6a. REP-PCR fingerprints of *Bacillus sporothermodurans* strains. Numbers refer to strains as mentioned in Table 1. Molecular marker 100bp (KiloBase™ DNA Marker - Amersham Bioscience) lane M, 100bp lane M' and 1kb (GeneRuler™ DNA Ladder - Fermentas) lane M''.

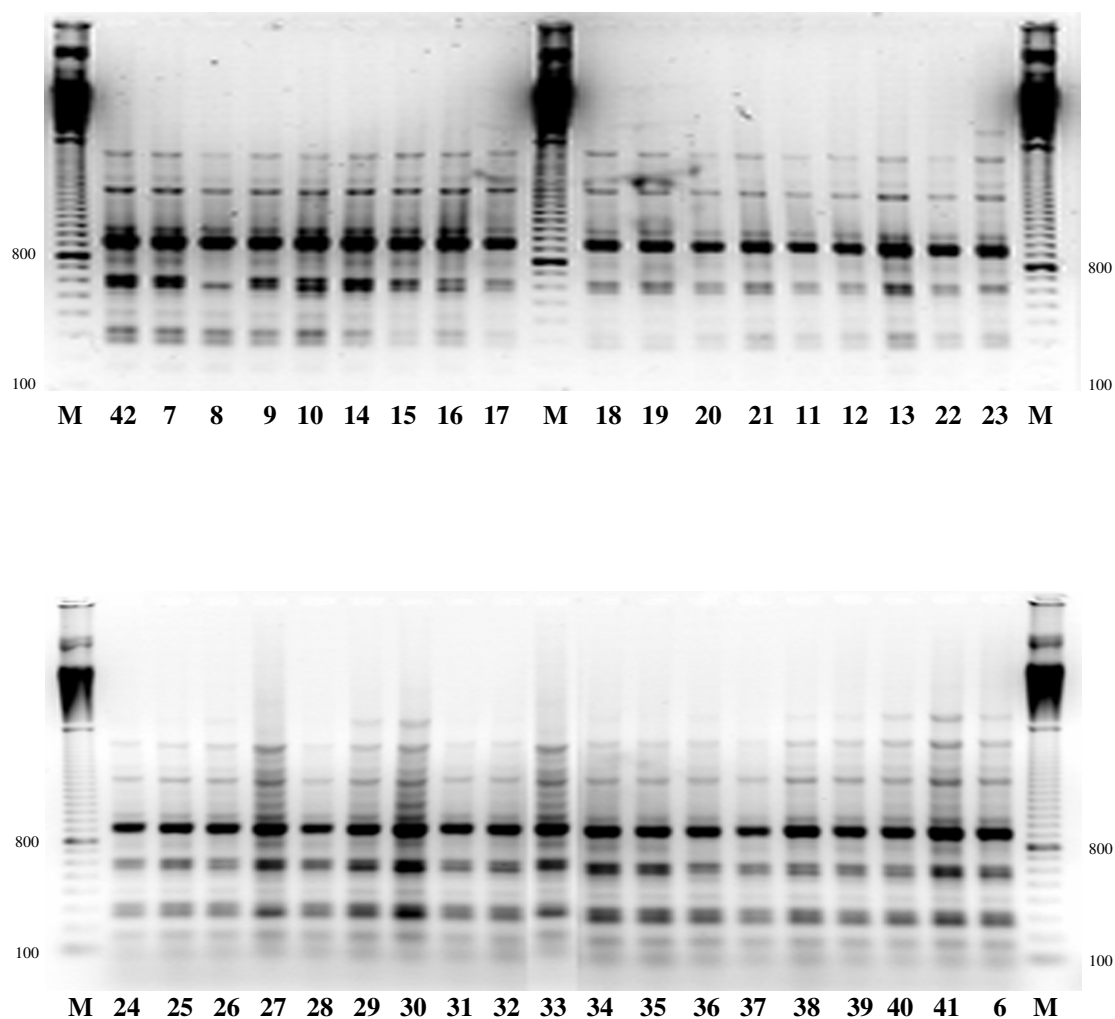


Figure 6b. REP-PCR fingerprints of *Bacillus sporothermodurans* strains. Numbers refer to strains as mentioned in Table 1. Molecular marker 100bp (KiloBaseTM DNA Marker - Amersham Bioscience) lane M, 100bp lane M' and 1kb (GeneRulerTM DNA Ladder - Fermentas) lane M''.

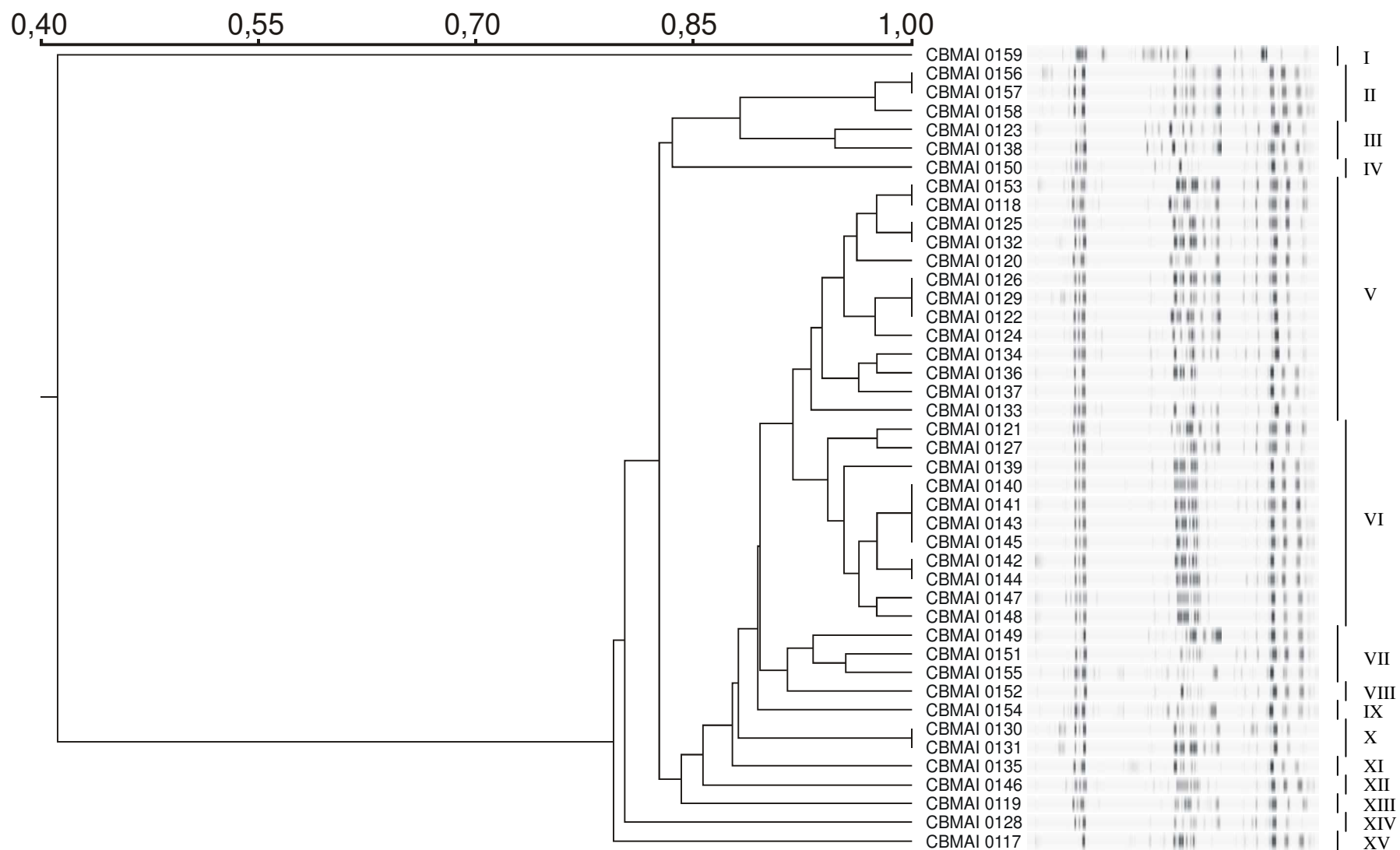


Figure 7. Relationship amongst strains of *B. sporothermodurans* based on rep-PCR fingerprint analysis. The scale bar indicates the percentage similarity as determined by using the Jaccard coefficient.

5 CONCLUSÕES GERAIS

O estudo de tipagem molecular dos microrganismos aqui estudados mostram que as culturas de *Bacillus sporothermodurans* são as responsáveis pela contaminação de leite tratado pelo processo UHT, possivelmente associado à produção de esporos altamente resistentes ao calor. Dos isolados testados, todos foram identificados como *Bacillus sporothermodurans* por PCR específico.

Isolados brasileiros de *Bacillus sporothermodurans* obtidos de leite UHT, bem como culturas européias foram diferenciados com sucesso pelas metodologias de tipagem molecular de elementos repetitivos no genoma (BOX-, ERIC- e REP-PCR).

As culturas européias de referência utilizadas nesse trabalho, provenientes da França, Alemanha, Itália e Bélgica, e as culturas brasileiras foram confirmadas como *Bacillus sporothermodurans* por PCR específico (HRS-PCR).

Devido ao fato das linhagens isoladas no Brasil apresentarem uma elevada diversidade genética, e serem diferentes das linhagens isoladas na Europa, presume-se que não há uma origem clonal (HRS clone) entre os dois continentes para esse microrganismo.

A contaminação de leite esterilizado e leite UHT em plantas industriais pode ser associada à contaminação das linhas de processamento por linhagens oriundas de reprocessamento de leite no sistema e, ocasionalmente, pela introdução, a partir do material obtido da fazenda, de novos tipos genéticos. Os dados aqui apresentados não favorecem ou eliminam quaisquer das duas possibilidades de contaminação mencionadas acima.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alves A., Santos O., Henriques I. & Correia A. (2002). Evaluation of methods for molecular typing and identification of members of the genus *Brevibacterium* and other related species. *FEMS Microbiology Letters*. **213**, 205-211.

Amonsin A., Wellehan J.F.X., Li L., Vandamme P., Lindeman C., Edman M., Robinson R.A. & Kapur V. (1997). Molecular epidemiology of *Ornithobacterium rhinotracheale*. *Journal Clinical Microbiology*. **35**, 2894-2898.

Appuhamy S., Parton R., Coote J.G. & Gibb H.A. (1997). Genomic fingerprinting of *Haemophilus somnus* by a combination of PCR methods. *Journal Clinical Microbiology*. **35**, 228-291.

Berthier F., Beuvier E., Dasen A. & Grappin R. (2001). Origin and diversity of mesophilic lactobacilli in comté chesse, as revealed by PCR with repetitive and species-specific primers. *International Dairy Journal*. **11**, 293-305.

Bouton Y., Guyot P., Beuvier E., Tailliez P. & Grappin R. (2002). Use of PCR-based methods and PFGE for typing and monitoring homofermentative lactobacilli during comté cheese ripening. *International Journal Food Microbiology*. **76**, 27-38.

Bouzar H., Jones J.B., Stall R.E., Louws F.J., Schneider M., Raddemaker W., de Bruijn & Jackson L.E. (1999). Multiphasic analysis of xanthomonads causing bacterial spot disease on tomato and pepper in the Caribbean and Central America: evidence for common lineages within and between countries. *Phytopathology*. **89**, 328-335.

Brasil, Ministério da Agricultura, Abastecimento e Reforma Agrária. Portaria n. 146 de 07 de março de 1996. Regulamentos técnicos de identidade e qualidade dos

produtos lácteos. *Diário Oficial da União*. Brasília, 11 de março de 1996. Seção 1. p.3978-3986.

Brumlik, M.J., Szymajda, U., Zakowska, D., Liang, X., Redkar, R.J., Patra, G. & Del Vecchio, V.G. (2001). Use of long-range repetitive element polymorphism-PCR to differentiate *Bacillus anthracis* strains. *Applied and Environmental Microbiology*. **67**(7):3021-3028.

Burton, H. (1969). Ultra High Temperature processed milk. *Dairy Science Abstracts*. **31** (6): 287-297.

Busta F.F. (1967). Thermal inactivation characteristics of bacterial spores at ultrahigh temperatures. *Applied Microbiology*. **15**, 640-645.

Chen M.L. & Tsen H.Y. (2002). Discrimination of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* with 16S rRNA and *gyrB* gene based PCR primers and sequencing of their annealing sites. *Journal Applied Microbiology*. **92**, 912-919.

Coelho P.S., Silva N., Brescia M.V. & Siqueira A.P. (2001). Avaliação da qualidade microbiológica do leite UAT integral comercializado em Belo Horizonte. *Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia*. **53**, 256-262.

Damgaard P.H., Jacobsen C.S. & Sorensen J. (1996). Development and application of a primer set for specific detection of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* in soil using magnetic captures hybridization and PCR amplification. *Systematic Applied Microbiology*. **19**, 436-441.

Da Mota F.F., Nóbrega A., Marriel I.E., Paiva E. & Seldin, L. (2002). Genetic diversity of *Paenibacillus polymyxa* population isolated from rhizosphere of four cultivars of maize (*Zea mays*) planted in Cerrado soil. *Applied Soil Ecology*. **20**, 119-132.

Da Silva K.R.A., Rabinovitch L. & Seldin, L. (1999). Phenotypic and genetic diversity among *Bacillus sphaericus* strains isolated in Brazil, potentially useful as biological control agents against mosquito larvae. *Research Microbiology*. **150**, 153-160.

Dawson S.L., Fry J.C. & Dancer B.N. (2002). A comparative evaluation of five typing techniques for determining the diversity of fluorescent pseudomonads. *Journal Microbiological Methods*. **50**, 9-22.

De Bruijn F.J. (1992). Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergeneric consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprinting the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. **58**, 2180-2187.

De Bruijn F.G., Rademaker J. & Schneider M. (1996). Rep-PCR genomic fingerprinting of plant-associated bacteria and computer-assisted phylogenetic analyses. In: Biology of Plant-Microbe Interaction; *Proceedings of the 8th International Congress of Molecular Plant-Microbe Interactions*. APS Press. 497-502.

De Silva S., Petterson B., De Muro M.A. & Fergus P. (1998). A DNA probe for the detection and identification of *Bacillus sporothermodurans* using the 16-23S rDNA spacer region and phylogenetic analysis of some field isolates of *Bacillus* which form highly heat resistant spores. *Systematic Applied Microbiology*. **21**, 398-407.

Forschino R., Gaill A. & Ottogalli G. (1990). Research on the microflora of UHT milk. *Annali di Microbiologia ed Enzymologia*. **40**, 47-59.

Franklin J.G. (1970). Spores in milk: problems associated with UHT processing. *Journal Applied Microbiology*. **33**, 180-191.

Gao J., Terefework Z., Chen W. & Lindström K. (2001). Genetic diversity of rhizobia isolated from *Astragalus adsurgens* growing in different geographical regions of China. *Journal Biotechnology*. **91**, 155-168.

Gevers D., Huys G. & Swings J. (2001). Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiology Letters*. **205**, 31-36.

Gilson E., Clément J.M., Brutlag D. & Hofnung M. (1984). A family of dispersed repetitive extragenic palindromic DNA sequences in bacteria. *EMBO Journal*. **3**, 1417-1421.

Gomez-de-leon, P., Santos J.I., Caballero J., Gómez D., Espinosa L.E., Moreno I., Piñero D. & Cravioto A. (2000). Genomic variability of *Haemophilus influenzae* isolated from mexican children determined by using enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences and PCR. *Journal Clinical Microbiology*. **38**, 2504-2511.

Guillaume-Gentil O., Scheldeman P., Marugg J., Herman L, Joosten H. & Heyndrickx M. (2002). Genetic heterogeneity in *Bacillus sporothermodurans* as demonstrated by ribotyping and repetitive extragenic palindromic-PCR fingerprinting. *Applied Environmental Microbiology*. **68**, 4216-4224.

Guinebretiere M.H., Berge O., Normand P., Morris C., Carlin F. & Nguyen-the C. (2001). Identification of bacteria in pasteurized zucchini purées stored at different temperatures and comparison with those found in other pasteurized vegetable purées. *Applied Environmental Microbiology*. **67**, 4520-4530.

Hammer P., Lembke F., Sahren G. & Heeschen W. (1995). Characterization of a heat resistant mesophilic *Bacillus* species affecting quality of UHT-milk – a preliminar report. *Kiel Milchwirtsch Forschungsber*. **47**, 303-311.

Hammer P. & Walte H.G. (1996) Zur Pathogenität hitzeresistenter mesophiler sporenbildner aus UHT-Milch. *Kiele-r Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*. **48**, 151-161.

Herman L.M.F., Vaerewijck M.J.M., Moermans R.J.B & Waes G.M.A.V.J. (1997). Identification and detection of *Bacillus sporothermodurans* spores in 1, 10, and

100 milliliters of raw milk by PCR. *Applied Environmental Microbiology*. **63**, 3139-3143.

Herman L. & Heyndrickx M. (2000). The presence of intragenically located REP-like elements in *Bacillus sporothermodurans* is sufficient for REP-PCR typing. *Research Microbiology*. **151**, 255-261.

Herman L., Heyndrickx M. & Waes G. (1998). Typing of *Bacillus sporothermodurans* and other *Bacillus* species isolated from milk by repetitive element sequence based PCR. *Letters in Applied Microbiology*. **26**, 183-188.

Huemer I.A., Klijn N., Vogelsang H.W.J. & Langeveld L.P.M. (1998). Thermal death kinetics of spores of *Bacillus sporothermodurans* isolated from UHT milk. *International Dairy Journal*. **8**, 851-855.

Hulton C.S.J., Higgins C.F. & Sharp P.M. (1991). ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and other enterobacteria. *Molecular Microbiology*. **5**, 825-834.

Kessler H.G., Pfeifer J. & Schwöppe C. (1994). Untersuchungen über hitze resistente mesophile *Bacillus*-sporen in UHT-milch. *Deutsche Milchwirtschaft*. **13**, 588-592.

Klijn, N., Herman, L., Langeveld, L., Vaerewijck, M., Wagendorp, A., Huemer, I. & Weerkamp, A. (1997). Genotypical and phenotypical characterization of *Bacillus sporothermodurans* strains, surviving UHT sterilization. *International Dairy Journal*. **7**, 421-428.

Lima, A.S.G., Guidelli, A.M., Abreu, I.L. & Lemos, M.V.F. (2002). Identification of new isolates of *Bacillus thuringiensis* using rep-PCR products and δ -endotoxin electron microscopy. *Genetics and Molecular Biology*. **25**, 2, 225-229.

Lopes S.A., Damann, K.E. & Grelen B.L. (2001). *Xanthomonas albilineans* diversity and identification based on rep-pcr fingerprintings. *Current Microbiology*. **42**, 155-159.

Louws F.J., Fulbright D.W., Stephens C.T. & Bruijn F.J. (1994). Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Annual Review Phytopathology*. **60**, 2286-2295.

Louws, F.J., Fulbright, D.W., Stephens, C.T., & de Bruijn, F.J. (1995). Differentiation of genomic structure by rep-PCR fingerprinting to rapidly classify *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopath.* 85:528-836.

Louws F.J., Rademaker J.L.W. & Bruijn F.J. (1999). The three ds of PCR-based genomic analysis of phyto bacteria: diversity, detection, and disease diagnosis. *Annual Review Phytopathology*. **37**, 81-125.

Lupski J.R. & Weinstock G.M. (1992). Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. *Journal of Bacteriology*. **174**, 4525-4529.

Martin J.H. (1974). Significance of bacterial spores in milk. *Journal Milk Food Technology*. **37**, 94-98.

Martin B., Humbert O., Camara M., Guenzi E., Walker J., Mitchell T., Andrew P., Prudhomme M., Alloing G. & Hakenbeck R. (1992). A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. *Nucleic Acid Research*. **20**, 3479-3483.

Miteva, V., Selenska-Pobell S. & Mitev V. (1999). Random and repetitive primer amplified polymorphic DNA analysis of *Bacillus sphaericus*. *Journal Applied Microbiology*. **86**, 928-936.

Montanari, G., Borsari, A., Chiavari, C., Ferri, G., Zambonelli, C. & Grazia, L. (2004). Morphological and phenotypical characterization of *Bacillus sporothermodurans*. *Journal of Applied Microbiology*. **97**, 802-809.

Mostert J.F., Lück H. & Husmann R.A. (1979). Isolation, identification and practical properties of *Bacillus* species from UHT and sterilized milk. *South African Journal Dairy Technology*. **11**, 125-132.

Olive M.D. & Bean P. (1999). Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *Journal of Clinical Microbiology*. **37**, 1661-1669.

Opgenorth D.C., Smart C.D., Louws F.J., de Bruijn, F.J. & Kirkpatrick B.C. (1996). Identification of *Xanthomonas fragariae* field isolates by rep-pcr genomic fingerprinting. *Plant Disease*. **80**, 868-873.

Petersen D.J., Shishido M., Holl F.B. & Chanway C.P. (1995). Use of species- and strain-specific PCR primers for identification of conifer root-associated *Bacillus* spp. *FEMS Microbiology Letters*. **133**, 71-76.

Petterson B., Lembke F., Hammer P., Stackebrandt E. & Priest F. (1996). *Bacillus sporothermodurans*, a new species producing highly heat-resistant endospores. *International Journal Systematic Bacteriology*. **46**, 759-764.

Pooler R.M., Ritchie D.F. & Hartung J.S. (1996). Genetic relationships among strains of *Xanthomonas fragariae* based on random amplified polymorphic DNA PCR, repetitive extragenic palindromic PCR, and enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR data and generation of multiplexed PCR primers useful for the identification of this phytopathogen. *Applied and Environmental Microbiology*. **62**, 3121-3127.

Rademaker J.L.W., Hoste B., Louws F.J., Kersters K., Swings J., Vauterin L., & de Bruijn F.J. (2000). Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting

with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **50**, 665-677.

Reva O.N., Sorokulova I.B. & Smirnov V.V. (2001). Simplified technique for identification of the aerobic spore-forming bacteria by phenotype. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **51**, 1361-1371.

Rice W.C. (1999). Specific primers for the detection of vip3A insecticidal gene within a *Bacillus thuringiensis* collection. *Letters Applied Microbiology*. **28**, 378-382.

Sambrook J., Fritsch E.F. & Maniats T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.

Sechi L.A., Zanetti S., Dupré I., Delogu G. & Fadda G. (1998). Enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences as molecular targets for typing of *Mycobacterium tuberculosis* strains. *Journal Clinical Microbiology*. **36**, 128-132.

Segner W.P., Frazier W.C. & Calbert H.E. (1963). Thermal inactivation of heat-resistant bacterial spores in milk concentrate at ultra-high temperatures. *Journal Dairy Science*. **46**, 891-896.

Scheldeman P., Herman L., Goris J., De Vos P. & Heyndrickx M. (2002). Polymerase chain reaction identification of *Bacillus sporothermodurans* from dairy sources. *Journal Applied Microbiology*. **92**, 983-991.

Shida O., takagi H., Kadowaki K., Nakamura, L.K. & Komagata K. (1997). Transfer of *Bacillus alginolyticus*, *Bacillus chondroitinus*, *Bacillus curdlanolyticus*, *Bacillus glucanolyticus* *Bacillus kobensis*, and *Bacillus thiaminolyticus* to the genus *Paenibacillus* and emended description of the genus *Paenibacillus*. *International Journal Systematic Bacteriology*. **47**, 289-298.

Stern M.J., Ames G.F.L., Smith N.H., Robinson E.C. & Higgins C.F. (1984). Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genomic. *Cell*. **37**, 1015-1026.

Teanpaisan R. & Douglas C.W.I. (1999). Molecular fingerprinting of *Porphyromonas gingivalis* by PCR of repetitive extragenic palindromic (REP) sequences and comparison with other fingerprinting methods. *Journal Medical Microbiology*. **48**, 741- 749.

Vaerewijck M.J.M., de Vos P., Lebbe L., Scheldeman P., Hoste B. & Heyndrickx M. (2001). Occurrence of *Bacillus sporothermodurans* and other aerobic spore-forming species in feed concentrate for dairy cattle. *Journal Applied Microbiology*. **91**, 1074-1084.

Van der Zee, A., Verbakel H., van Zon J.C., Frenay I., van Belkum A., Peeters M., Buiting A. & Bergmans A. (1999). Molecular genotyping of *Staphylococcus aureus* strains: comparison of repetitive element sequence-based PCR with various typing methods and isolation of a novel epidemicity marker. *Journal Clinical Microbiology*. **37**, 342-349.

Vauterin L., Raudemaker J. & Swings J. (2000). Synopsis on the taxonomy of the genus *Xanthomonas*. *Phytopathology*. **90**, 677-682.

Versalovic J., Koeuth T. & Lupski J.R. (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application of fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acid Research*. **19**, 6823-6831.

Versalovic J., Schneider M., de Bruijn F.J. & Lupski J.R. (1994). Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology*. **5**:5-25.

Vila J., Marcos M.A. & Jimenez de Anta M.T. (1996). A comparative study of different PCR-based DNA fingerprinting techniques for typing of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*A. baumannii* complex. *Journal Medical Microbiology*. **44**, 482-489.

Vinuesa P., Rademaker J.L.W., de Bruijn F.J. & Werner D. (1998). Genotypic characterization of *Bradyrhizobium* strains nodulating endemic woody legumes of the

Canary islands by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of genes encoding 16S rRNA (16S rDNA) and 16S-23S rDNA intergenic spacers, repetitive extragenic palindromic PCR genomic fingerprinting, and parcial 16S rDNA sequencing. *Applied Environmental Microbiology*. **64**, 2096-2104.

Westhoff D.C. & Dougherty S.L. (1981). Characterization pf *Bacillus* species isolated from spoiled ultrahigh temperature processed milk. *Journal Dairy Science*. **64**, 572-580.

Wieser M. & Busse H.J. (2000). Rapid identification of *Staphylococcus epidermidis*. *International Journal Systematic Evolutionary Microbiology*. **50**, 1087-1093.

Woese C.R. (1987). Bacterial evolution. *Microbial Review*, **51**: 221-272.

Woese C.R. (1992). Prokaryote systematics: the evolution of a science. *In: The Prokaryotes*. 2º ed, pp. 3-18. (A. Ballows, H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder & K.H. Schleifer, Eds.), Springer-Verlag, New York.

Yamazaki K., Teduka H., Inoue N. & Shinano H. (1996). Specific primers for detection of *Alicyclobacillus acidoterrestris* by RT-PCR. *Letters Applied Microbiology*. **23**, 350-354.

Zhang Y.C., Ronimus, R.S., Turner, N., Zhang, Y. & Morgan, H.W. (2002). Enumeration of thermophilic *Bacillus* species in composts and identification with a random amplification polymorphic DNA (RAPD) protocol. *Systematic and Applied Microbiology*. **25**, 618-626.

7 ANEXOS

Table 1. Binary data derived from BOX-PCR electrophoretic band profile for different cultures of *Bacillus sporothermodurans*.

CBMAI strains	Bands*												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
0159	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
0156	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0
0157	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0
0158	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0
0153	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1
0118	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1
0119	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1
0120	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1
0121	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1
0125	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1
0126	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0
0127	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1
0128	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0
0129	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0
0130	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0
0131	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0
0132	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1
0122	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0
0123	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0
0124	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0
0133	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1
0134	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1
0135	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1
0136	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1
0137	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1
0138	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1
0139	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0
0140	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1
0141	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1
0142	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1
0143	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1
0144	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1
0145	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1
0146	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0
0147	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1
0148	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1
0149	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1
0150	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1
0151	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1
0152	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1
0117	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1
0154	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1
0155	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1

*Zero = absence and 1 = presence.

Table 2. Binary data derived from REP-PCR electrophoretic band profile for different cultures of *Bacillus sporothermodurans*.

CBMAI strains	Bands*																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
0159	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1
0156	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0157	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0158	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0153	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0118	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0119	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1
0120	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0121	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0125	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0126	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0127	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0128	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0129	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0130	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0131	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0132	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0122	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0123	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0124	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0133	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0134	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0135	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0136	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0137	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0138	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0139	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0140	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0141	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0142	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0143	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0144	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0145	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0146	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0147	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0148	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0149	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0150	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0151	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0152	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0117	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0154	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0155	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

*Zero = absence and 1 = presence.

Table 3. Binary data derived from ERIC-PCR electrophoretic band profile for different cultures of *Bacillus sporothermodurans*.

CBMAI strains	Bands*														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
0159	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0
0156	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1
0157	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1
0158	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1
0153	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0118	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0119	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0120	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0121	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0125	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0126	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0127	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0128	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1
0129	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0130	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0131	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0132	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0122	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0123	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1
0124	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
0133	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
0134	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
0135	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0136	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0137	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1
0138	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1
0139	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0140	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0141	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0142	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0143	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0144	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0145	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0146	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0147	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0148	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0149	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
0150	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0
0151	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0152	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1
0117	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0154	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
0155	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1

* Value (zero) = absence e valor 1 = presence