

# Detecção de *Bacillus cereus* em leite e avaliação da germinação dos esporos após tratamento térmico

## Detection of *Bacillus cereus* in milk samples and assessment of the spores germination after milk thermal treatment

RIALA6/1176

Mílina Martinelli WATANUKI<sup>1\*</sup>, Cláudio Rosa GALLO<sup>2</sup>

\*Endereço para correspondência: Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, ESALQ/USP Av. Pádua Dias, 11. CEP 13418-900. C.P. 09. Piracicaba, SP/Brasil, e-mail: [milenamw@yahoo.com.br](mailto:milenamw@yahoo.com.br)

<sup>1</sup>Ciência e Tecnologia de Alimentos, Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", ESALQ/USP, Piracicaba, SP/Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/ESALQ/USP. Piracicaba, SP/Brasil.

Recebido: 28/04/2008 – Aceito para publicação: 18/09/2008

### RESUMO

A análise microbiológica tem sido ferramenta fundamental para a obtenção de dados sobre a qualidade, higiene e segurança na produção de alimentos e essa medida tem sido adotada na indústria alimentícia para o controle de qualidade. Foram analisadas 75 amostras de leite, com o intuito de investigar a presença de *Bacillus cereus* em amostras de leite fluido. A capacidade de germinação de esporos e a multiplicação da bactéria foram averiguadas após o tratamento térmico das amostras do leite e, então, mantidas a temperatura ambiente e sob refrigeração por até 12 horas. Das 75 amostras, 46 (61,3%) mostraram-se contaminadas por *B. cereus* antes de serem submetidas à fervura. Amostras mantidas a temperatura ambiente após o aquecimento apresentaram contagens bacterianas superiores à contagem inicial, o que indica a ocorrência da germinação dos esporos e a multiplicação das células vegetativas. As alíquotas dessas mesmas amostras, mantidas sob refrigeração (7°C), não apresentaram população bacteriana elevada. Estes fatos enfatizam a importância da refrigeração do leite após o tratamento térmico, para assegurar a qualidade do produto a ser oferecido à população.

**Palavras-chave.** germinação, esporos, tratamento térmico, leite, *Bacillus cereus*.

### ABSTRACT

The microbiological analysis has been the fundamental tool for achieving data on food production quality, sanitation, hygiene and safety, and these procedures have been adopted by food industry for setting the quality control. A total of 75 milk samples were analyzed in order to determine the occurrence of *Bacillus cereus* and to assess the spores germination and the bacteria growth after performing milk thermal treatment. One portion of the boiled milk samples was kept at room temperature, and another was maintained at 7°C for up 12 hours. In 46 (61.3%) out 75 analyzed samples, *B. cereus* was found in milk samples before being boiled. The boiled milk samples maintained at room temperature presented higher bacteria counting than those found in the initial counting, indicating the occurrence of spores germination multiplication of the vegetative cells. In those boiled samples kept at 7°C no much bacteria increase was observed. These findings emphasize the importance in storing the boiled milk samples at refrigeration temperature, for avoiding the further bacteria proliferation.

**Key words.** germination, spores, thermal treatment, milk, *Bacillus cereus*.

## INTRODUÇÃO

O leite é um dos alimentos mais completos, mas sua composição química e a microbiota que o acompanha o torna um produto altamente perecível, necessitando para sua conservação, de adequados tratamentos higiênicos e tecnológicos<sup>1</sup>.

No Brasil, a produção leiteira ainda apresenta obstáculos na cadeia produtiva, especialmente em relação às condições higiênico-sanitárias, que comprometem a qualidade final do produto, causam modificações físico-químicas e sensoriais, que limitam a durabilidade do leite e seus derivados, além de representarem problemas econômicos e de saúde pública<sup>2</sup>.

Tendo em vista a importância do leite na alimentação de indivíduos de todas as faixas etárias, torna-se necessário que sua qualidade seja garantida<sup>3</sup>. Por esse motivo, a qualidade desse produto tem merecido a atenção de numerosos pesquisadores e autoridades ligadas à área de saúde e tecnologia de alimentos, principalmente pelos riscos de veiculação de microrganismos patogênicos e deterioradores<sup>4</sup>.

Dentre os vários microrganismos que podem contaminar o leite “in natura” por meio das fezes e camas dos animais, poeira, equipamentos e utensílios deficientemente higienizados, destacam-se as bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus*, especialmente *Bacillus cereus*. São bactérias habitantes naturais do solo que estão frequentemente presentes no leite cru<sup>1,5,6</sup>, sendo a resistência ao calor uma característica comum, pelo fato de esporularem<sup>7</sup>.

A presença do *B. cereus* no leite é uma das maiores preocupações na indústria de laticínios<sup>8</sup>. Esse microrganismo pode causar alterações sensoriais no leite<sup>8,9,10</sup>, além de ser responsável por surtos de intoxicação alimentar.

Em doenças de origem alimentar causada por *B. cereus*, duas síndromes distintas são conhecidas, uma de natureza diarreica devido ao consumo de leite e seus derivados, produtos cárneos, molhos, sopas e vegetais, e outra emética, associada à ingestão da toxina produzida em arroz frito e cozido, massas e macarrões. Ambas são autolimitantes e a recuperação ocorre dentro de 24 horas<sup>6,11</sup>.

Nestes tipos de enfermidade, o alimento implicado geralmente foi tratado com calor, e os esporos sobreviventes são a origem das síndromes. O tratamento térmico estimula a germinação dos esporos que, na ausência da microbiota competitiva, encontra condições favoráveis para proliferar no produto. Nos últimos anos, o reconhecimento de cepas psicotróficas de *B. cereus* na indústria leiteira tem conduzido a uma vigilância aumentada deste patógeno<sup>12</sup>.

O presente trabalho procurou detectar *B. cereus* em amostras de leite cru, pasteurizado (A, B e C) e UAT (ultra-alta temperatura) disponíveis no mercado, bem como avaliar a germinação de esporos e a multiplicação dessa bactéria logo após o processo de tratamento térmico, com manutenção das amostras à temperatura ambiente e sob refrigeração. Ao realizar estes procedimentos, semelhantes aos executados normalmente

pelos consumidores, pretenderam-se analisar e avaliar os riscos que tais processos representam à saúde pública.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Matéria-prima

Foram analisadas 10 amostras de leite cru, 10 amostras de leite pasteurizado tipo A, 25 amostras de leite pasteurizado tipo B, 25 amostras de leite pasteurizado tipo C e 5 amostras de leite UAT. Todas as 75 amostras foram coletadas em diversos estabelecimentos do comércio varejista da região de Piracicaba, estado de São Paulo.

### Tratamento das amostras

Em todas as amostras foi realizada análise microbiológica para detecção de *B. cereus*. Após a retirada da alíquota necessária para tal análise, procedeu-se ao tratamento térmico do restante da amostra. O tratamento térmico consistiu de fervura do leite em bécquer sob a chama de bico de Bunsen. A chama foi desligada após a subida do leite no interior do bécquer. Procurou-se realizar este procedimento por ser semelhante ao executado pelos consumidores deste alimento em suas residências.

Os recipientes contendo as amostras que foram submetidas ao processo de fervura permaneceram em repouso à temperatura ambiente e tampados (resfriamento natural). Decorridas 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 horas da fervura, a presença de *B. cereus* foi analisada nos tempos 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 horas.

A temperatura e o pH das amostras de leite foram determinados no momento das análises. A análise de *B. cereus* nas amostras do leite mantidas a temperatura ambiente por intervalos de tempos diferentes foi feita com o intuito de avaliar a segurança microbiológica desse procedimento.

Também visando analisar o efeito da refrigeração na manutenção das amostras após o processo de fervura, alíquotas de 250mL foram refrigeradas a 7°C após 20 minutos da fervura e analisadas após 6, 8, 10 e 12 horas para a contagem de *B. cereus*.

### Contagem de *B. cereus*

O número presuntivo de *B. cereus* foi determinado pelo método de contagem direta em placas<sup>13</sup>. Foram realizados plaqueamentos pela técnica de espalhamento em superfície no meio Agar Manitol-Gema de Ovo-Polimixina (MYP-A) utilizando-se alça de Drigalsky, espalhando-se 0,1mL do leite e de cada diluição em placas de Petri. As placas foram incubadas a 30°C/24-48 horas para a contagem das colônias típicas (colônias esféricas, com bordas perfeitas, planas, secas e cerosas, rodeadas por um grande halo róseo de precipitação). Todas as colônias típicas de *B. cereus* foram isoladas para serem submetidas às provas bioquímicas para a caracterização da espécie.

Os seguintes exames morfológicos e bioquímicos foram realizados, visando confirmar a presença de *B. cereus*: coloração

de Gram, coloração de esporos, utilização anaeróbia de glicose, decomposição de tirosina, redução de nitrato e reação de Voges Proskauer.

As colônias formadas por bastonetes Gram-positivos, esporulados, móveis, capazes de fermentar a glicose anaerobicamente com produção de ácido, reduzir o nitrato a nitrito, produzir acetilmetilcarbinol a partir da glicose e decompor tirosina foram consideradas como de *B. cereus*<sup>13</sup>.

Uma vez identificados, os isolados caracterizados como *B. cereus* tiveram suas contagens expressas como unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL) das amostras de leite examinadas. Foi calculado o número de UFC/mL em função do número de colônias típicas, diluição inoculada e percentagem de colônias confirmadas<sup>14</sup>.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nas contagens de *B. cereus* estão apresentados na Tabela 1, revelando a presença deste patógeno em 46 das 75 amostras de leite analisadas (incidência de 61,33%).

Verifica-se uma variação acentuada na ocorrência desse microrganismo em função do tipo de leite, com as maiores incidências ocorrendo nos leites tipo B e C, que apresentaram, respectivamente, 88% e 80% das amostras contaminadas. Estes valores foram superiores a percentagem de contaminantes encontrados das amostras de leite cru (40%), que não é submetido a nenhum tipo de tratamento térmico a fim de diminuir a população contaminante inicial. Não foi detectada a presença de *B. cereus* nas amostras de leite pasteurizado tipo A e nas amostras de leite UAT analisadas antes do tratamento térmico.

Essas diferenças na ocorrência da contaminação por *B. cereus* se devem, provavelmente, às melhores condições de higiene na ordenha e a refrigeração da matéria-prima, adotadas na produção de leite tipo A, o que contribui para a redução da contaminação e para o controle da multiplicação dos microrganismos eventualmente presentes. As diferenças na incidência de contaminação por *B. cereus* nas amostras de leite cru e leites pasteurizados do tipo B e C podem ser decorrentes de falhas no processo de pasteurização, contaminação pós-pasteurização e/ou esporos de *B. cereus* provenientes do leite cru (matéria-prima excessivamente contaminada). Também deve-se considerar que no processo de pasteurização comercial do leite, efetuado a 70-75°C durante 15 segundos, as células vegetativas dos microrganismos, exceto alguns termodúricos, são inativadas. Portanto, a presença de *B. cereus* nas amostras analisadas poderia ser devida unicamente aos esporos presentes na matéria-prima que sobreviveram e até foram ativados durante a pasteurização com a conseqüente germinação e posterior multiplicação no leite; ou então, à recontaminação do produto pós-pasteurização por células ou esporos aderidos aos equipamentos e formando biofilmes.

A Tabela 2 mostra os dados compilados da incidência de *B. cereus* e respectivas médias e desvio padrão nos diferentes

tipos de leite.

Com relação aos valores encontrados, a maior incidência do microrganismo ocorreu nas amostras de leite pasteurizado tipo C, seguido pelas amostras de leite pasteurizado tipo B.

Os relatos de incidência de contaminação por *Bacillus* em leite têm despertado grande demanda por pesquisas.

Silveira et al.<sup>15</sup> analisaram amostras de leite pasteurizado tipos A, B e C na cidade de São Paulo e encontraram presença do *B. cereus* em 28,7% de 430 analisadas.

Já Griffiths<sup>16</sup>, no Canadá, avaliou a ocorrência de *Bacillus* spp em amostras de leite cru e pasteurizado, constatou que, de 150 amostras analisadas, 105 (70%) apresentaram uma microbiota representativa do gênero *Bacillus*, sendo cepas de *B. cereus* detectadas em 37,3% das amostras de leite cru e 36,5% das de leite pasteurizado. Granum, Brynstad e Kramer<sup>17</sup> verificaram que, de 85 colônias de *B. cereus* isoladas de produtos lácteos (leite desnatado, leite semi-desnatado e creme de leite), 59% se revelaram enterotoxigênicas e 15% psicrotróficas.

Rangasamy, Iver e Roginski<sup>18</sup>, ao estudarem 91 amostras de leite e produtos lácteos coletados em Vitória, Austrália, encontraram *B. cereus* em 26,4% das amostras analisadas, exceto em amostras de leite UAT. Schoken-Iturrino, Filho e Dimenstein<sup>7</sup> analisaram 32 amostras de leite longa vida de quatro marcas diferentes na região de Ribeirão Preto, SP, onde evidenciaram a presença de bactérias do gênero *Bacillus* em 19 (59,37%).

Te Giffel et al.<sup>19</sup> investigaram 334 amostras de leite pasteurizado semi-desnatado, sendo encontrada, em 40% das

**Tabela 1.** Ocorrência de *Bacillus cereus* em amostras de leites crus, pasteurizados e UAT coletados no comércio da região de Piracicaba/SP, durante os meses de janeiro a junho de 2007.

Tipos de leite	Amostras analisadas	Amostras contaminadas	
		Nº	%
Cru	10	4	40
A	10	0	0
B	25	22	88
C	25	20	80
UAT	5	0	0
<b>Total</b>	<b>75</b>	<b>46</b>	<b>61,33</b>

**Tabela 2.** Incidência de *B. cereus* nas amostras de leite analisadas.

Tipos de leite	Média (UFC/mL)	Desvio-padrão
Cru	$7,2 \times 10^2$	$2,2 \times 10^3$
A	<10	0
B	$8,4 \times 10^2$	$2,1 \times 10^3$
C	$1,3 \times 10^4$	$5,0 \times 10^4$
UAT	<10	0

amostras, a presença presuntiva de *B. cereus* em baixas contagens, variando de 50 a 5000 UFC/mL.

Lin et al.<sup>20</sup> realizaram o procedimento de rastreamento de contaminação por *B. cereus* em usina de leite através de amostragem do leite em vários pontos durante o processamento do mesmo, além de coleta de amostras de superfícies do ambiente por meio de *swab*. Os autores encontraram baixo número de células vegetativas de *B. cereus* no leite cru, porém foi detectado números na faixa de 10<sup>5</sup> UFC/mL de esporos dessa bactéria. Essa contagem foi similar à das células vegetativas encontradas no leite pasteurizado. Os resultados obtidos sugerem que a maior fonte de contaminação por *B. cereus* em leite pasteurizado vem a ser os esporos de *B. cereus* do leite cru. A contaminação pós-pasteurização através das linhas de processamento ou ambiental teria pouca importância na contaminação do produto. Com o desenvolvimento das técnicas de caracterização molecular Svensson et al.<sup>21</sup> utilizaram, com sucesso, a técnica de RAPD – PCR para uma prolongada investigação de fontes de contaminação em usina de leite. Grandes grupos (*clusters*) de isolados geneticamente relacionados foram encontrados no silo de armazenamento pré-pasteurização e no produto final durante os dois anos da duração da coleta, indicando um provável foco de contaminação persistente neste silo.

Rezende<sup>22</sup> citado por Sanchez<sup>23</sup> analisou 120 amostras de leite integral UAT produzidas no Brasil, na procura por espécies do grupo *B. cereus*. Seus resultados indicaram uma positividade em 34,17% do total de amostras analisadas, sugerindo a necessidade de melhorias nas condições higiênico-sanitárias adotadas no processo térmico comercial do produto.

Estudo realizado por Cardoso<sup>24</sup> revelou a presença do *B. cereus* em 48,3% de 240 amostras de leite A, B e C analisados na região de Campinas. Foram detectadas baixas populações, na faixa de 10<sup>2</sup> UFC/mL, com maior frequência no leite tipo C. Não houve detecção de cepas psicrotóxicas nas amostras analisadas. Para Cardoso<sup>24</sup>, esse resultado é compatível com aqueles obtidos por autores internacionais em que a presença de *B. cereus* em leite pasteurizado oscila entre 36% e 56%. Rezende, Rossi e Amaral<sup>25</sup> ao analisarem 120 amostras de quatro diferentes marcas de leite UHT encontraram bactérias do grupo do *Bacillus cereus* em 34,1% das amostras estudadas.

Ao compararmos com a literatura os valores de incidência do *B. cereus* nas amostras de leite pasteurizado do presente trabalho, verifica-se que das 60 amostras analisadas, em 42 o *B. cereus* estava presente, ou seja, 70% das amostras de leite pasteurizado estavam positivas para este microrganismo, indicando uma ocorrência elevada para esse tipo de leite. Já para as amostras de leite UAT, a incidência ficou bem abaixo da literatura consultada, uma vez que em 100% das amostras analisadas estavam com uma contagem média de *B. cereus* <10 UFC/mL. Com relação às amostras de leite cru, os valores encontraram-se próximo (40%) de outros pesquisadores.

Em seguida, as amostras foram submetidas à fervura para dar seguimento a segunda etapa do trabalho. A média da temperatura de fervura de todos os tipos de leite foi de 100,01°C e a temperatura das amostras mantidas à temperatura ambiente após 1 hora de fervura foi de 31,59°C.

Nota-se que, após as amostras serem submetidas à fervura houve um aumento significativo na população do

**Tabela 3.** Contagens médias de *B. cereus*, temperatura e pH médio em cada tempo analisado.

Tipos de leite	Variável	1h	2h	4h	6h	8h	10h	12h
<b>Cru</b>	T(°C)	33,0	29,0	27,5	28,3	27,0	27,0	27,0
	UFC/mL	3,3x10	3,3x10	2,3x10 <sup>2</sup>	2,2x10 <sup>2</sup>	8,4x10 <sup>2</sup>	1,1x10 <sup>4</sup>	6,6x10 <sup>4</sup>
	pH	6,2	6,2	6,1	5,6	5,4	5,4	5,4
<b>A</b>	T(°C)	31,1	29	28,8	28,8	28,1	27,2	26,7
	UFC/mL	<10	<10	<10	<10	<10	8,8x10	3,5x10 <sup>3</sup>
	pH	6,2	6,2	6,2	5,9	5,8	5,9	5,7
<b>B</b>	T(°C)	30,9	29,3	30,0	29,5	28,0	27,0	26,6
	UFC/mL	0,3x10	0,6x10	0,5x10	4,2x10 <sup>2</sup>	1,2x10 <sup>4</sup>	1,2x10 <sup>5</sup>	7,4x10 <sup>5</sup>
	pH	6,3	6,3	6,4	6,3	6,2	6,2	6,2
<b>C</b>	T(°C)	30,8	29,3	27,8	27,7	27,7	26,8	26,0
	UFC/mL	1,7x10	1,7x10	1,4x10 <sup>2</sup>	8,6x10 <sup>3</sup>	1,5x10 <sup>4</sup>	1,5x10 <sup>5</sup>	5,9x10 <sup>5</sup>
	pH	6,4	6,4	6,3	6,1	6,0	5,9	5,9
<b>UAT</b>	T(°C)	32	30,8	30,6	31,0	30,5	29,3	29,0
	UFC/mL	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
	pH	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,9

microrganismo a partir da sexta hora (notadamente nos leites pasteurizados B e C), uma vez que com a fervura, os esporos sobreviventes germinaram, aumentando, conseqüentemente, o número de células vegetativas. A Tabela 3 apresenta as contagens médias de *B. cereus* e os respectivos valores médios de temperatura e pH em cada tempo analisado, para as amostras mantidas à temperatura ambiente após o processo de fervura.

Analisando a Tabela 3, nota-se que nas amostras de leites pasteurizados tipos B e C, bem como nas amostras de leite cru analisadas a manutenção a temperatura ambiente por 10 a 12 horas após o processo de fervura resultou em populações de *B. cereus* de  $10^4$  e  $10^5$  UFC/mL. Estes números elevados de *B. cereus* podem se constituir em risco para a saúde do consumidor. As amostras de leite pasteurizado tipo A analisadas atingiram contagens máximas de *B. cereus* de  $3,5 \times 10^3$  UFC/mL após 12 horas do processo de fervura e mantidas à temperatura ambiente. Estes números baixos de contaminantes provavelmente não se constitui em risco para a saúde. As amostras de leite UAT analisadas não se apresentaram contaminadas por *B. cereus* em nenhum dos tempos em que foram analisadas, o que demonstra a eficácia do processo de ultrapasteurização do leite tipo longa vida. Observa-se que, as medidas de temperatura e pH não variaram entre as amostras analisadas a partir da 2ª hora após a fervura e se encontram em faixa considerada adequada para o crescimento de *B. cereus*.

Na Tabela 4 podem ser observadas as contagens médias de colônias *B. cereus* e os respectivos valores médios de

temperatura e pH das amostras analisadas após a fervura e manutenção a 7°C da 6ª até a 12ª hora.

Fica evidente o benefício da manutenção das amostras de leite após a fervura sob refrigeração, uma vez que em nenhuma das amostras analisadas, a população de *B. cereus* foi acima de  $8,1 \times 10^2$  UFC/mL.

É interessante frisar que a temperatura observada nos refrigeradores dos pontos de comercialização onde as amostras de leite pasteurizado tipos A, B e C foram obtidas, encontrava-se entre 10 e 12°C, portanto, acima da temperatura recomendada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para leite e derivados, que deve ser 7-8°C.

## CONCLUSÃO

Apesar da legislação brasileira atual não estabelecer padrões para a contagem de *B. cereus* em leite fluido, de acordo com os resultados obtidos, verificou-se que amostras de leites pasteurizados tipos B e C apresentaram-se com populações de  $10^4$  -  $10^5$  UFC/mL. Estes índices de contaminação considerados elevado para leites caracterizados como pasteurizados evidenciam a precariedade higiênica na cadeia produtiva do leite. Amostras de leite cru, pasteurizados tipos B e C mantidas à temperatura ambiente após a fervura (resfriamento lento) atingiram números de *B. cereus* capazes de desencadear um quadro gastroentérico. Este fato é minimizado mantendo o

**Tabela 4.** Contagens médias de *B. cereus*, temperatura e pH médio das amostras analisadas da 6ª a 12ª hora após a fervura e sob refrigeração.

Tipos de leite	Variável	6h	8h	10h	12h
<b>Cru</b>	T(°C)	10,0	9,0	8,0	8,0
	UFC/mL	$5,0 \times 10$	$5,3 \times 10$	$7,6 \times 10$	$7,3 \times 10^2$
	pH	5,5	5,5	5,5	5,5
<b>A</b>	T(°C)	10,2	10,0	9,4	9,0
	UFC/mL	<10	<10	<10	<10
	pH	5,4	5,5	5,5	5,5
<b>B</b>	T(°C)	10,2	9,5	9,0	8,3
	UFC/mL	<10	$0,2 \times 10$	$2,8 \times 10^2$	$8,1 \times 10^2$
	pH	5,2	5,3	5,2	5,2
<b>C</b>	T(°C)	9,7	9,5	9,0	8,5
	UFC/mL	$0,5 \times 10$	$1,3 \times 10$	$7,8 \times 10$	$1,8 \times 10^2$
	pH	5,3	5,3	5,3	5,3
<b>UAT</b>	T(°C)	9,0	9,0	9,0	8,0
	UFC/mL	<10	<10	<10	$0,3 \times 10$
	pH	5,7	5,8	5,8	5,9

produto em condições de temperatura abaixo de 10°C, em combinação com pH e atividade de água, aliado ao emprego de uma matéria-prima de boa qualidade e a realização correta dos procedimentos industriais.

Como recomendação, em função dos resultados obtidos na presente pesquisa, deve ser enfatizada a necessidade de rápido resfriamento do leite após a fervura e manutenção do mesmo a temperatura de refrigeração, para evitar que esporos sobreviventes de *B. cereus* germinem levando a multiplicação das células vegetativas com riscos de toxinfecção alimentar.

## REFERÊNCIAS

1. Bartoszewicz M, Hansen BM, Swiecicka I. The members of the *Bacillus cereus* group are commonly present contaminants of fresh and heat – treated milk. *Food Microb.* 2008.
2. Freitas JA, Oliveira JP, Galindo GAR. Avaliação da qualidade higiênico-sanitária do leite exposto ao consumo na região metropolitana de Belém-PA. *Rev Inst Adolfo Lutz*.2005; 264(2): 212-8.
3. Tavares SG. Avaliação das condições microbiológicas de leite pasteurizado tipos A, B e C, comercializados na cidade de Piracicaba, SP (Dissertação de mestrado) Piracicaba, São Paulo: Universidade de São Paulo, 1996. 84 pp.
4. Quintana RC, Carneiro LC. Avaliação do leite *in natura* comercializado clandestinamente no município de Morrinhos, GO. *Rev Inst Adolfo Lutz*.2006; 65(3):194-8.
5. Christiansson A, Bertilsson J, Svensson B. *Bacillus cereus* spores in raw milk: factors affecting the contamination of milk during the grazing period. *J Dairy Sci*.1998; 82:305-14.
6. Rosslund E, Andersen Borge GI, Langsrud A, Sorhaug T. Inhibition of *Bacillus cereus* by strains of *Lactobacillus* and *Lactococcus* in milk. *Int J Food Microbiol*.2003; 89:205-12.
7. Schoken-Iturrino RP, Filho AN, Dimenstein AR Ocorrência de bactérias esporuladas dos gêneros *Bacillus* e *Clostridium* em amostras de leite longa vida. *Hig Aliment*.1996; 10(42): 25-7
8. Lin S, Schraft H, Odumeru JA, Griffiths MW. Identification of contamination sources of *Bacillus cereus* in pasteurized milk. *Int J Food Microbiol*.1998;43:159-71.
9. Becker H, Schaller G, Wiese W. Von, Terplan G. *Bacillus cereus* in infant foods and dried milk products. *Int J Food Microbiol*.1994;23: 1-15.
10. Mäntynen V, Lindström K. A Rapid PCR-Based DNA Test for enterotoxic *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol*.1998; 64(5):1634-9.
11. Agata N, Ohta M, Yokoyama K. Production of *Bacillus cereus* emetic toxin (cereulide) in various foods. *Int J Food Microbiol*.2002; 73:23-7.
12. Granum PE. *Bacillus cereus*. In: Doyle, MP, Beuchat, LR, Montville, TJ, editors. *Microbiología de los alimentos: fundamentos y fronteras*. Zaragoza: Acribia; 1997. p. 343-353.
13. Silva N da, Junqueira VCA, Silveira, NFA, Taniwaki, MH, Gomes, AR. *Bacillus cereus*. In: Silva N da, Junqueira VCA, Silveira, NFA, Taniwaki, MH, Gomes, AR *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos*. São Paulo: Livraria Varela; 2007. p.149-160.
14. International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). *Bacillus cereus*. In:ICMSF. *Microrganismos de los Alimentos: características de los patógenos microbianos*. Zaragoza: Acribia; 1996. p. 25-42.
15. Silveira VV, Sakuma H, Duarte M, Rodas MAB, Saruwatari JK, Chicourel EL Avaliação das condições físico-químicas e microbiológicas do leite pasteurizado consumido na cidade de São Paulo. *Rev Inst Adolfo Lutz*.1989; 49(1): 19-25.
16. Griffiths MW. *Bacillus cereus* in liquid milk and other milk products. *Bul Int Dairy Fed*.1992; 275: 36-9.
17. Granum PE, Brynestad S, Kramer JM. Analysis of enterotoxin production by *Bacillus cereus* from dairy products, food poisoning incidents and non-gastrointestinal infections. *Int J Food Microbiol*.1993; 17(4): 269-79.
18. Rangasamy PN, Iyer M, Roginski H. Isolation and characterization of *Bacillus cereus* in milk and dairy products manufactured in Victoria. *Aust J Dairy Technol*.1993; 48(2): 93-5.
19. Te Giffel MC, Beumer RR, Granum PE, Rombouts FM. Isolation and characterization of *Bacillus cereus* from pasteurized milk in household refrigerators in the Netherlands. *Int J Food Microbiol*.1997;34(3):307-18.
20. Lin S, Schraft H, Odumeru JA, Griffiths MW. Identification of contamination sources of *Bacillus cereus* in pasteurized milk. *Int J Food Microbiol*.1998; 43:159-71.
21. Svensson B, Monthán A, Shaheen R, Andersson MA, Salkinoja-Salonen M, Christiansson A. Occurrence of emetic toxin producing *Bacillus cereus* in the dairy production chain. *Int Dairy J*.2006; 16:740-76.
22. Rezende NCM. Ocorrência de bactérias do grupo *B. cereus* e de microrganismos indicadores em leite UHT integral (Dissertação de mestrado). Jaboticabal, São Paulo: Universidade Estadual Paulista, 1998. 82pp.
23. Sanchez CPP. Ocorrência de *Bacillus cereus*, avaliação de sua resistência térmica em sistema contínuo e seu controle em leite UHT (Tese de doutorado). Campinas, São Paulo: Universidade Estadual de Campinas, 2005. 255pp.
24. Cardoso ALMP. Ocorrência, multiplicação e produção de toxina diarreica por cepas mesófilas e psicrotróficas de *Bacillus cereus*, em leite pasteurizado (tese de doutorado). Campinas, São Paulo: Universidade Estadual de Campinas, 2000. 95pp.
25. Rezende NCM, Rossi JOD, Amaral LA. Ocorrência de bactérias do grupo do *Bacillus cereus* em leite UHT integral (ultra-high-temperature). *Rev Bras Ciênc Vet*. 2000; 7(3): 162-6.