

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

**OCORRÊNCIA, MULTIPLICAÇÃO E PRODUÇÃO DE
TOXINA DIARRÉICA POR CEPAS MESÓFILAS E
PSICROTRÓFICAS DE *Bacillus cereus*, EM LEITE
PASTEURIZADO**

Ângela Líbia de Melo Pereira Cardoso

Orientador: Prof. Dr. Mauro Faber de Freitas Leitão

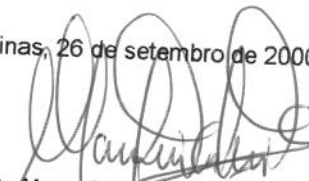
Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, para
obtenção do título de Doutor em Tecnologia de Alimentos

PARECER

Este exemplar corresponde à
redação final da tese defendida por
Ângela Líbia de Melo Pereira
Cardoso aprovada pela Comissão
Julgadora em 26 de setembro de
2000.

Campinas, SP
2000

Campinas, 26 de setembro de 2000


Prof. Dr. Mauro Faber de Freitas Leitão
Presidente da Banca



DATA BC
 CHAMADA:
UNICAMP
21790
 Ex.
 WBO BC/ 43019
 DC. 16-278100
 C ☐ D ☒
 ECO R\$11,00
 TA 07111100
 CPD

CM-00147200-1

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

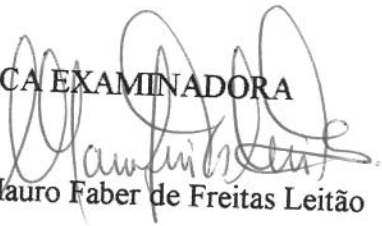
C179o

Cardoso, Ângela Líbia de Melo Pereira
Ocorrência, multiplicação e produção de toxina diarréica
por cepas mesófilas e psicrotróficas de *Bacillus cereus*, em
leite pasteurizado / Ângela Líbia de Melo Pereira. –
Campinas, SP: [s.n.], 2000.

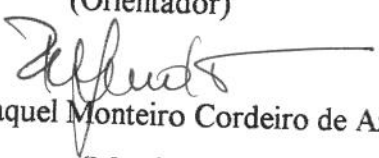
Orientador: Mauro Faber de Freitas Leitão
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. *Bacillus cereus*. 2. Leite - Pasteurização.
3. Refrigeração. 4. Enterotoxinas. I. Leitão, Mauro Faber de
Freitas. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Engenharia de Alimentos. III. Título.

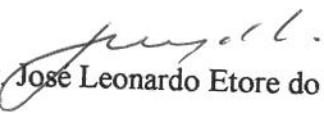
BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. Mauro Faber de Freitas Leitão

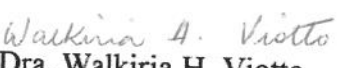
(Orientador)


Profª Dra. Raquel Monteiro Cordeiro de Azeredo

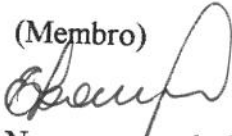
(Membro)


Dr. José Leonardo Eto do Valle

(Membro)


Profª Dra. Walkiria H. Viotto

(Membro)


Prof. Edir Nepomuceno da Silva

(Membro)

Profª Dra. Marise Aparecida Rodrigues Pollonio

(Membro)

Prof. Dr. Salvador Massaguer Roig

(Membro)

Campinas, de de 2000

Deus, obrigado, em todos os momentos,

Vós estivesdes do meu lado

Ao meu marido José Cardoso,
Meus filhos Cardosinho e Flavinho,
Pela dedicação, carinho e amor sempre
presentes em todos os momentos,
Dedico

Em memória do meu maior amigo e
incentivador, meu pai, que, se aqui estivesse,
muito se orgulharia.

À minha melhor amiga e incentivadora de
todos os momentos, que soube suportar com
coragem e amor todas as horas de saudades que
passou, provocada pela distância ao longo de
todos esses anos: minha mãe.

AGRADECIMENTOS

À Julia Martins Rego, pelo carinho e dedicação ao longo de todos esses anos, em que me acompanha e principalmente pelo amor dedicado aos nossos filhos, ajuda imprescindível para que eu pudesse terminar este trabalho em tempo hábil muito obrigado.

À Universidade do Amazonas (UA) e a CAPES-PICD, pelo apoio financeiro concedido para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus colegas professores do Departamento de Medicamento e Alimentos (DMA), pelo encorajamento e principalmente por terem assumido meus encargos durante os períodos de afastamento, em especial às professoras Maria de Menezes e Marlene Donádio, que em muito incentivaram nessa jornada.

Ao Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), onde pude desenvolver parte dos meus experimentos, contando com a boa vontade dos pesquisadores (Neusely, Neliane, Marta e Valéria), técnicos (Dionir, especialmente à técnica Rosana F. Siqueira), estagiários (Claudia, Valéria) e todos os funcionários do Laboratório de Microbiologia meu muito obrigado.

À Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), pelos conhecimentos transmitidos, em especial ao Departamento de Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA), representado pelos professores e funcionários.

Aos funcionários da Biblioteca e da secretaria de pós-graduação, pelo especial atendimento em todos os momentos que foram solicitados.

Ao meu orientador, professor Dr. Mauro F. de Freitas Leitão, pela carinhosa acolhida e pela forma segura, coerente e sobretudo pela confiança que em mim depositou ao longo desses anos.

À professora e amiga Raquel Monteiro C. de Azeredo, pelo incentivo, pelas correções e sugestões feitas à redação da tese e mais do que tudo, pela sua valiosa amizade.

Às amigas Valéria Junqueira, Margareth Batistella de Araujo e Cristina que generosamente me abriram as portas de suas casas, pelo convívio agradável que pude partilhar com suas famílias em tempos de redação e correção da tese. Principalmente pelas sugestões e a indispensável colaboração quanto aos ajustes de digitação. nas longas noites em claro, o meu muito obrigado.

Ao amigos Barata e Solange pela valiosa amizade, espírito de companheirismo, nos momentos mais difíceis por ocasião da digitação da tese

Às amigas do Laboratório de Higiene de Alimentos da FEA, Dirce e Arnaldo, Raquel Manhani, em especial dona Jacinta, que estava sempre pronta a colaborar sem medir nenhum esforço, Maria Helena, Izabela, Pedro, Daniel, Ana, Carla, Graziella, Juliane, Cida Ana Lourdes, enfim todos aqueles com quem convivi e juntos passamos tantos momentos agradáveis ao longo desses anos.

A todos os amigos conquistados em Campinas, obrigado pelo carinho, pela amizade e pelo agradável convívio e principalmente pela demonstração de carinho à minha família pela ocasião de nossa partida.

Enfim, a todos os meus muitos amigos e parentes que de uma forma ou de outra, muito contribuíram me incentivando, principalmente com seu carinho e solidariedade, para que pudessem chegar ao fim desse trabalho o meu muito obrigado.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	ii
RESUMO.....	iii
SUMMARY.....	v
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE INDÚSTRIAS DE LATICÍNIOS	4
3.2. MICROBIOTA DO LEITE	5
3.3. CARACTERÍSTICAS DE <i>BACILLUS CEREUS</i>	11
3.3.1. <i>Taxonomia e Identificação</i>	11
3.3.2. <i>Patogenicidade de B. cereus</i>	14
3.3.3 <i>Epidemiologia de Bacillus cereus</i>	23
3.4. <i>BACILLUS CEREUS</i> NA INDÚSTRIA DE LATICÍNIOS	28
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1. LEVANTAMENTO DA OCORRÊNCIA DE CEPAS MESÓFILAS E PSICOTRÓFICAS DE <i>B. CEREUS</i> , EM LEITE COMERCIAL PASTEURIZADO.....	32
4.1.1. <i>Amostragem</i>	32
4.1.2 <i>Tratamento das amostras</i>	33
4.1.3 <i>Contagem, isolamento e confirmação de B. cereus</i>	33
4.2. INFLUÊNCIA DO ARMAZENAMENTO SOB REFRIGERAÇÃO NA MULTIPLICAÇÃO DE CEPAS PSICOTRÓFICAS DE <i>B. CEREUS</i> , NATURALMENTE PRESENTES EM LEITE	37
4.2.1. <i>Amostragem</i>	37
4.2.2. <i>Procedimento experimental</i>	37
4.3. INOCULAÇÃO DE <i>B. CEREUS</i> EM LEITE, SUA MULTIPLICAÇÃO E ATIVIDADE DETERIORADORA EM DIFERENTES TEMPERATURAS.....	38

4.3.1. MATERIAL.....	38
4.3.2. <i>Preparo das suspensões de esporos</i>	38
4.3.3. <i>Procedimento experimental</i>	38
4.4. AVALIAÇÃO DA POSSIBILIDADE DE SELEÇÃO GRADATIVA DE CEPAS PSICOTRÓFICAS DE <i>B. CEREUS</i> , A PARTIR DE CEPAS ORIGINALMENTE MESÓFILAS.....	39
4.4.1. <i>Cepas utilizadas</i>	39
4.4.2. <i>Preparo das suspensões de B. cereus</i>	40
4.4.3. <i>Multiplicação de B. cereus em leite incubado a 7°C</i>	40
4.5. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE PRODUÇÃO DE ENTEROTOXINA POR CEPAS DE <i>B. CEREUS</i> ISOLADAS DE LEITE.	41
4.5.1. <i>Cepas utilizadas</i>	41
4.5.2. <i>Procedimento experimental</i>	41
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
5.1. LEVANTAMENTO DA OCORRÊNCIA DE CEPAS MESÓFILAS E PSICOTRÓFICAS DE <i>B. CEREUS</i> , EM LEITE COMERCIAL PASTEURIZADO.....	43
5.2. INFLUÊNCIA DO ARMAZENAMENTO SOB REFRIGERAÇÃO NA MULTIPLICAÇÃO DE CEPAS PSICOTRÓFICAS DE <i>B. CEREUS</i> NATURALMENTE PRESENTES EM LEITE.....	55
5.3. INOCULAÇÃO DE <i>B. CEREUS</i> EM LEITE, SUA MULTIPLICAÇÃO E SUA ATIVIDADE DETERIORADORA EM DIFERENTES TEMPERATURAS	56
5.4. AVALIAÇÃO DA POSSIBILIDADE DE SELEÇÃO GRADATIVA DE CEPAS PSICOTRÓFICAS DE <i>B. CEREUS</i> A PARTIR DE CEPAS ORIGINALMENTE MESÓFILAS	63
5.5. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE PRODUÇÃO DE ENTEROTOXINA POR CEPAS DE <i>B. CEREUS</i> ISOLADAS DE LEITE.	68
6. CONCLUSÕES.....	73
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

LISTA DE TABELAS

TABELA 2.1 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS CULTURAIS E BIOQUÍMICAS QUE DIFERENCIAM ESPÉCIES DE <i>B. CEREUS</i>	14
TABELA 2.2 INCIDÊNCIA DE <i>B. CEREUS</i> EM DIVERSOS ALIMENTOS.....	26
TABELA 4.1 CARACTERIZAÇÃO DE BIOTIPOS DE <i>B. CEREUS</i>	36
TABELA 5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS CEPAS TÍPICAS, ISOLADAS DE AMOSTRAS DE LEITE PASTEURIZADO, QUANTO AOS TESTES MORFO-TINTÓRIAS E BIOQUÍMICOS, PARA INCLUSÃO NO GRUPO DE <i>B. CEREUS</i>	43
TABELA 5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS CEPAS CONFIRMADAS NO GRUPO DE <i>B. CEREUS</i> QUANTO AOS TESTES PARA A DIFERENCIAÇÃO A NÍVEL DE ESPÉCIE.....	44
TABELA 5.3 BIOTIPOS DE <i>B. CEREUS</i> NAS AMOSTRAS COMERCIAIS DE LEITE.....	46
TABELA 5.4 OCORRÊNCIA DE <i>B. CEREUS</i> EM AMOSTRAS DE LEITE PASTEURIZADO A, B E C	47
TABELA 5.5 CONTAGENS TOTAIS E DE ESPOROS DE <i>B. CEREUS</i> EM LEITE PASTEURIZADO TIPO A DE DIFERENTES MARCAS COMERCIAIS (UFC/mL).....	49
TABELA 5.6 CONTAGENS TOTAIS E DE ESPOROS DE <i>B. CEREUS</i> EM LEITE PASTEURIZADO TIPO B DE DIFERENTES MARCAS COMERCIAIS (UFC/mL).....	50
TABELA 5.7 CONTAGENS TOTAIS E DE ESPOROS DE <i>B. CEREUS</i> EM LEITE PASTEURIZADO TIPO C DE DIFERENTES MARCAS COMERCIAIS (UFC/mL).....	51
TABELA 5.8 CONTAGENS MÉDIAS* DE <i>B. CEREUS</i> EM LEITE PASTEURIZADO DE DIFERENTES TIPOS E MARCAS COMERCIAIS.....	54
TABELA 5.9 CRESCIMENTO DE <i>B. CEREUS</i> EM LEITE INCUBADO EM DIFERENTES TEMPERATURAS	56
TABELA 5.10 VARIAÇÕES DO PH E ACIDEZ TITULÁVEL DO LEITE INOCULADO EXPERIMENTALMENTE E INCUBADO A DIFERENTES TEMPERATURAS.....	61
TABELA 5.11 COMPORTAMENTO DE CEPAS DE <i>B. CEREUS</i> ORIGINALMENTE MESÓFILAS, ADAPTADAS AO CRESCIMENTO EM LEITE MANTIDO A 7°C.....	63
TABELA 5.12 ESTIMATIVAS DE TEMPOS DE GERAÇÃO (G) DE <i>B. CEREUS</i> EM LEITE INCUBADO A 7°C ..	66
TABELA 5.13 ESTIMATIVA DO *TEMPO (DIAS) NECESSÁRIO PARA SE ALCANÇAR POPULAÇÕES DE 10 ⁶ UFC/DE <i>B. CEREUS</i> , EM LEITE A 7°C	67
TABELA 5.14 PRODUÇÃO DE ENTEROTOXINA POR <i>B. CEREUS</i> EM CALDO BHI E LEITE, COM INCUBAÇÃO A 30°C.....	69
TABELA 5.15 INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES DE INCUBAÇÃO NA PRODUÇÃO DE ENTEROTOXINA EM LEITE.....	69

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 5.1 CRISTAIS PARAESPORAIS DE <i>BACILLUS THURINGIENSIS</i> (CORADOS PELO MÉTODO DE SHARIFF, 1988)	45
FIGURA 5.2 CRESCIMENTO DE <i>B. CEREUS</i> EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE TEMPO E TEMPERATURA	57
FIGURA 5.3 LEITE INOCULADO COM <i>B. CEREUS</i> E INCUBADO A 5° C PELO PERÍODO DE 14 DIAS.....	58
FIGURA 5.4 A LEITE INOCULADO COM <i>B. CEREUS</i> INCUBADO A 20°, 15° E 10°C - 2º DIA DE INCUBAÇÃO	59
FIGURA 5.4 B LEITE INOCULADO COM <i>B. CEREUS</i> INCUBADO A 20°, 15° E 10°C - 4º DIA DE INCUBAÇÃO	59
FIGURA 5.4 C LEITE INOCULADO COM <i>B. CEREUS</i> INCUBADO A 20°, 15° E 10° C - 6º DIA DE INCUBAÇÃO	60
FIGURA 5.4 D LEITE INOCULADO COM <i>B. CEREUS</i> INCUBADO A 20°, 15° E 10° C - 8º DIA DE INCUBAÇÃO	60
FIGURA 5.5 COMPORTAMENTO DE <i>B. CEREUS</i> NO LEITE MANTIDO A 7° C, APÓS SUCESSIVAS TRANSFERÊNCIAS.....	64
FIGURA 5.6 PRODUÇÃO DE ENTEROTOXINA EM LEITE INOCULADO COM CEPAS DE <i>B. CEREUS</i> INCUBADO A 20°C.....	71
FIGURA 5.7 PRODUÇÃO DE ENTEROTOXINA EM LEITE INOCULADO COM <i>B. CEREUS</i> A 15°C DEPOIS DE 7 DIAS DE INCUBAÇÃO.	71
FIGURA 5.8 CEPAS NÃO PRODUTORAS DE ENTEROTOXINA A 5°C APÓS 12 DIAS DE INCUBAÇÃO.....	72

RESUMO

Nesta pesquisa foi avaliada a ocorrência de *Bacillus cereus* em amostras de leite comercial pasteurizado, bem como seu potencial de deterioração em função da temperatura de incubação e a capacidade de produção de enterotoxina diarreica nesse substrato. Numa etapa inicial foram analisadas 240 unidades de amostras de leite comercial pasteurizado dos tipos A, B e C, estudando-se a presença e os níveis de contaminação por células vegetativas e esporos de *B. cereus* mesófilo e psicrótrófico. Os resultados revelaram a presença da bactéria em 116 (48,3%) das unidades de amostra analisadas, com maiores incidências nos leites tipo C comparativamente ao B e A (67,5 50 e 27,5 % de positividade nos tipos C, B e A respectivamente). Predominaram níveis baixos de contaminação, na faixa de 10^2 UFC/mL, com maiores contagens nas amostras de leite tipo C, comparativamente aos outros tipos. Em nenhuma das amostras analisadas constatou-se a presença de cepas psicrótróficas de *B. cereus*. Nos ensaios envolvendo a inoculação experimental de amostras de leite seguido de incubação às temperaturas de 5°, 10°, 15° 20° e 30°C, verificou-se a ausência de alterações nas temperaturas mais baixas (5° e 10°C) e o rápido crescimento e deterioração nas amostras mantidas acima de 15°C. As alterações mais pronunciadas foram evidenciadas pela coagulação do leite, nítida separação de fases com reduzidas modificações nos valores de pH e acidez titulável. Comprovou-se a possibilidade seleção de gradativa de cepas capazes de crescimento em temperatura de refrigeração (7°C), partindo-se de cepas originalmente mesófilas; no entanto, o processo de seleção foi lento, sendo que somente após 21 dias de incubação as culturas apresentaram multiplicação mais rápida, com tempo de geração (G) mínimo de 2,17 dias. Quanto à capacidade de produção de enterotoxina por teste imunoenzimático, na maioria das

cepas isoladas e testadas foram observados resultados positivos, tanto em meios de cultura como utilizando o leite como substrato. No entanto, nas amostras de leite inoculadas experimentalmente, a produção de enterotoxina somente foi constatada em temperaturas acima de 15°C, não sendo observada nas amostras mantidas sob refrigeração (7° e 5°C), mesmo após 12 dias de incubação.

SUMMARY

The incidence of *Bacillus cereus*, its spoilage potential in relation to the incubation temperature and the capacity of diarrheic enterotoxin production were evaluated in commercial pasteurized milk samples. A total of 240 samples of pasteurized milk types A, B and C were analysed for the incidence and counts of mesophilic and psychrotrophic *B. cereus*. The results showed the occurrence of *B. cereus* in the 116 (48.3%) of the examined samples with higher incidence in type C when compared to the types B and A (67,5, 50.0 and 27,5% of positive samples for types C, B and A respectively). In most of the samples prevailed counts around 10^2 CFU/mL, with higher values in type C milk when compared to types B and A. No psychrotrophic strains were isolated in the examined samples. In the experiments involving inoculation of *B. cereus* in milk samples followed by incubation at different temperatures it was noticed that *B. cereus* was not able to grow at refrigeration temperatures (5° and 10°C) but with fast growth and spoilage activity at higher temperatures (15°, 20° e 30°). The main evidences of spoilage were characterized by coagulation and clear separation of phases but without remarkable changes in pH and total acidity values. In an other experiment it was shown the possibility of gradual selection of psychrotrophic *B. cereus* strains originating from originally mesophilic cultures. However this selection was gradual and only after an incubation period of 21 days the selected strains showed multiplication with a minimum "G" value of 2.17 days. Most of the tested strains originally isolated from commercial milk samples showed capacity of diarrheic enterotoxin production both in culture media and milk samples. However in the inoculated milk samples the enterotoxin production was observed only in incubation temperatures above 15°C, without production at 7°C and 5°C even after 12 days of incubation.

1. INTRODUÇÃO

As bactérias esporuladas estão entre as principais responsáveis por problemas de deterioração na indústria de alimentos, sendo que as do gênero *Bacillus* são amplamente disseminadas no ambiente, podendo contaminar matérias-primas e alimentos processados, provocando diferentes tipos de alterações (Stadhouders, 1993; Andersson *et al.*, 1995; Te Giffel *et al.*, 1996; Schoken-Iturrino e Nader Filho, 1996; Frank, 1997; Moreno *et al.*, 1999).

No caso específico de leite industrializado (pasteurizado ou esterilizado comercialmente) a contaminação por bactérias do gênero *Bacillus*, especialmente *Bacillus cereus*, representa um problema bastante difícil de ser controlado (Griffiths, 1992; Te Giffel *et al.*, 1996; Frank, 1997). A literatura aponta três aspectos importantes decorrentes da presença de *B. cereus* nessa matéria-prima: primeiro, parece ser muito difícil evitar-se completamente a contaminação da mesma, uma vez que esta bactéria (na forma de células vegetativas ou esporos) é amplamente disseminada no ambiente natural, principalmente no solo, de onde se transfere para o úbere da vaca; segundo, os esporos são muito hidrofóbicos, com capacidade de adesão às superfícies dos equipamentos utilizados no processamento do leite e formação de biofilmes de remoção muito difícil (Husmark e Ronner, 1990; Andersson *et al.*, 1995; Schoken-Iturrino e Nader Filho, 1996; Larsen e Jorgensen, 1997); finalmente, a temperatura de pasteurização do leite é insuficiente para destruir os esporos que permanecem viáveis no produto pasteurizado.

Embora seja tipicamente uma bactéria mesófila, mais recentemente, tem sido descrita a ocorrência e isolamento de cepas psicotróficas, principalmente no leite pasteurizado; esses relatos são mais freqüentes em países escandinavos e outros países europeus, principalmente na Holanda, (Bidochka *et al.*, 1987; Stadhouders, 1993; Driessen, 1993; Langeveld *et al.*, 1996; Te Giffel *et al.*, 1996), ao passo que há poucas informações de idêntica ocorrência no Brasil (Almeida, 1998; Gomes e Lemos, 1999).

UNICAMP

BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Essas cepas parecem ser capazes de colonizar os equipamentos e o ambiente industrial de produção do leite pasteurizado, com um tempo de geração de 8h em leite armazenado a 7°C (Andersson *et al*, 1995; Langeveld, *et al.*, 1996; Foegeding e Berry, 1997) e passando a dominar a microbiota do produto armazenado sob refrigeração.

Considerando-se a importância desse microrganismo como agente de deterioração e de doenças de origem alimentar, torna-se de grande interesse o conhecimento mais detalhado da sua ocorrência no ambiente e seu crescimento nos alimentos. Com este enfoque principal, procurou-se desenvolver tal estudo no leite pasteurizado, de diferentes tipos e procedências, levando em consideração principalmente o consumo elevado do alimento, freqüentemente por parcelas vulneráveis da população (lactentes, crianças, convalescentes e idosos) e nem sempre produzido, comercializado e armazenado em condições ideais, no aspecto higiênico-sanitário.

2. OBJETIVOS

A presente pesquisa foi conduzida com os seguintes objetivos:

- 2.1 - Estudar a ocorrência de *Bacillus cereus* em amostras comerciais de leite bovino pasteurizado, de diferentes tipos e procedências;
- 2.2 - Estudar a influência do armazenamento sob refrigeração na proliferação de *B. cereus* psicrotrófico presente naturalmente em amostras de leite;
- 2.3 - Avaliar, mediante inoculações experimentais, as alterações provocadas pela bactéria em leite armazenado sob diferentes condições de tempo e temperatura;
- 2.4 - Avaliar a possibilidade de seleção gradativa de cepas psicrotróficas de *B. cereus*, a partir de cepas originalmente mesófilas, presentes no leite;
- 2.5 - Verificar a produção de enterotoxina em leite inoculado experimentalmente e mantido em diferentes temperaturas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Considerações gerais sobre indústrias de laticínios

O leite apresenta um excepcional valor nutritivo, atribuído à presença de proteínas, carboidratos, gordura, sais minerais e vitaminas em teores adequados, tanto no aspecto qualitativo como quantitativo (Pelckzar *et al.*, 1986). Nesse contexto, o leite destinado ao consumo humano tem despertado a atenção de pesquisadores, tendo em vista a sua importância nos aspectos nutricional, econômico, social e de saúde pública, sob o enfoque global de segurança alimentar.

As empresas de laticínios representam um mercado que movimenta bilhões de dólares no mundo inteiro. Segundo a Federação Internacional de Laticínios (FIL/IDF, 1998), a produção de leite, no mundo, passou de 300 milhões de toneladas, em 1991, para 557 milhões de toneladas, em 1997, sendo a produção de leite de vaca a que mais cresceu nos últimos anos, atingindo a marca de 471 milhões de toneladas produzidas anualmente. A Europa é um dos maiores produtores de leite, seguido da América do Norte, Ásia e América do Sul, que 64% do leite cru produzido mundialmente industrializado nas mais variadas formas.

No Brasil, de acordo com a Federação Internacional de Laticínios (FIL/IDF, 1998), a produção de leite está estimada em 20 milhões de toneladas, obtida principalmente por pequenos produtores ou através de cooperativas que encontram grandes dificuldades para produzir leite de boa qualidade. Em função do clima quente, a conservação do leite torna-se extremamente crítica tanto pela falta de uma adequada infra-estrutura de manuseio do leite cru, como pela demora no transporte desde a fazenda até a plataforma de recepção da indústria. Além disso, as condições higiênico-sanitárias insatisfatórias contribuem para a proliferação de microrganismos contaminantes e, conseqüentemente, prejudicam a qualidade do leite (Huhn *et al.*,

1980; Costa *et al.*, 1984; Martins e Nussbaum, 1984; Mutukumira *et al.*, 1996; Isepon *et al.*, 1999).

É certo que a utilização de sistemas de refrigeração, desde a ordenha até o momento de processamento, tem sido a solução ideal recomendada para diminuir o crescimento microbiano. Entretanto, no Brasil e outros países em desenvolvimento, os quais enfrentam sérios problemas econômicos, soluções dessa natureza nem sempre são viáveis, devido a seu alto custo. Na tentativa de viabilizar o pequeno produtor de leite, nos últimos seis anos foram criadas as mini-usinas, que são micro-indústrias onde se produz ou se recebe, beneficia e empacota leite, até o limite de 3.000 litros ao dia (Isepon *et al.*, 1999). Essas micro-indústrias deveriam ter condições de realizar todas as fases de beneficiamento como as grandes indústrias, inclusive controle das análises físico-químicas, enzimáticas e microbiológicas. Entretanto, sabe-se que, apesar das análises físico-químicas serem normalmente realizadas diariamente, o mesmo não acontece com as análises microbiológicas, que são realizadas periodicamente (Isepon *et al.*, 1999). Nessas condições, é muito incipiente o controle da contaminação microbiana que, acrescida à manutenção da matéria-prima em condições inadequadas de temperatura, compromete em muito a qualidade do leite, o que pode ser crítico em função do tipo de utilização previsto.

3.2. Microbiota do leite

O leite apresenta uma microbiota complexa e diversa, oriunda de várias fontes, desde microrganismos originalmente presentes no canal mamário até contaminantes veiculados por manipuladores e pelo ambiente (Matilla *et al.*, 1990; Frank, 1997). Esses microrganismos podem proliferar com grande facilidade no leite, um excelente substrato para o desenvolvimento microbiano, principalmente devido ao pH próximo a neutralidade e à variedade de nutrientes naturalmente presentes (Frank,

1997). Mesmo que o leite recém-ordenhado possa conter inibidores microbianos naturais, como as lactoferrinas e o sistema de lactoperoxidase (LP), sua eficiência antimicrobiana diminui durante a estocagem (Batist *et al.*, 1988; Walfson e Summer, 1993; Frank, 1997), favorecendo, portanto, a multiplicação tanto dos microrganismos que constituem a microbiota normal e não chegam a alterar a qualidade do leite, quanto daqueles que são agentes deteriorantes. Além disso, o leite pode ser veículo de bactérias potencialmente patogênicas, particularmente enterobactérias dos gêneros *Salmonella* e *Shigella*, ao lado de *Brucella* e outros gêneros e espécies (Pelckzar *et al.*, 1986; Matilla *et al.*, 1990; Frank, 1997).

Entre os principais grupos de bactérias deterioradoras presentes no leite, destacam-se as bactérias lácticas, coliformes, psicrótróficas e termodúricas. A recontaminação do leite pode ocorrer após a pasteurização, sendo motivo de especial preocupação, já que bactérias psicrótróficas desenvolvem-se rapidamente em temperaturas de refrigeração, sendo importantes agentes de deterioração, principalmente as dos gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus* (Griffiths *et al.*, 1981; Granum, 1997).

Durante o processo de pasteurização do leite cru, a carga bacteriana mais representativa possui baixa resistência térmica, sendo eliminada durante o tratamento térmico. A microbiota do leite pasteurizado é essencialmente restrita às bactérias termodúricas presentes inicialmente no leite cru, além daquelas provenientes de recontaminação do produto pasteurizado, principalmente devido à limpeza e sanificação inadequadas das superfícies de contato dos equipamentos. O número e a diversidade dos microrganismos contaminantes são muito influenciados pelas temperaturas prevaletentes na manipulação e estocagem desse leite (Burton, 1986; Bidochka *et al.*, 1987; Stadhouders, 1993; Driessen 1993; Langeveld, *et al.*, 1996; Te Giffel *et al.*, 1996).

Segundo Patel *et al.* (1983), em leite pasteurizado são encontrados números reduzidos de microrganismos sobreviventes do tratamento térmico, principalmente psicrotróficos. Esses autores afirmam que o leite pasteurizado deve ser estocado a 7°C por uma semana antes de os psicrotróficos resistentes ao calor serem detectados. O que depende, obviamente, da microbiota inicial.

Estudos realizados por Meer *et al.* (1993) indicaram que a microbiota do leite tratado termicamente e estocado sob refrigeração consistia de 83% de *Bacillus*, mostrando dessa forma, que os microrganismos mais resistentes são bactérias aeróbias ou facultativas, formadoras de esporos. Esses resultados confirmam a importância do grupo denominado termodúricos, que não é caracterizado pela temperatura ótima de crescimento, mas sim pela sua resistência térmica, capaz de sobreviver ao tratamento térmico utilizado na pasteurização do leite (72°C por 15 segundos ou 63°C por 30 minutos).

Estudos realizados por Johnston e Bruce (1982) demonstraram que as contagens de esporos em amostras de leite pasteurizado foram maiores do que as observadas no mesmo leite ainda cru. Os autores atribuíram o fato à contaminação por esporos provenientes dos equipamentos, em virtude das falhas de higienização nas usinas. Estudos semelhantes também foram realizados por Mahari e Gashe (1992) que indicaram níveis de 14% de termodúricos em leite cru fresco, contra 39,5% para o leite pasteurizado.

Segundo Phillips e Griffiths (1986), parece não existir correlação absoluta entre o número total de bactérias e o de esporos, embora um número elevado de esporos esteja geralmente associado a uma população elevada de bactérias.

De uma forma geral, os microrganismos termorresistentes podem influenciar diretamente na qualidade do leite, em função das evidentes alterações de odor, sabor e diminuição de sua qualidade, tornando-o, muitas vezes, impróprio para

consumo (Goepffert *et al.*, 1972; Andersson *et al.*, 1995). Por esta razão, Mottar e Waes (1986) sugerem que o controle desses termodúricos em leite cru pode ser um recurso importante para garantir a qualidade do leite pasteurizado. Segundo Auclair (1986), a vida de prateleira de um leite pasteurizado pode se estender por seis semanas, quando estocado a 6°C ou menos, caso a contagem de bactérias termodúricas no leite cru inicial seja menor que 10^4 UFC/mL.

Vanderberg (1986) recomenda que o número de termodúricos deve ser controlado em estabelecimentos de pasteurização de leite, principalmente quando os trocadores de calor são utilizados durante períodos prolongados, em geral acima de 6h.

Entre as espécies do gênero *Bacillus*, um dos principais representantes do grupo dos termodúricos, são de ocorrência usual no leite principalmente *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pumilus* e *B. cereus* (Angula *et al.*, 1989). Dentro desse grupo, a presença freqüente de microrganismos capazes de se desenvolver à temperatura de refrigeração (psicrotróficos) é um sério problema para a indústria de laticínios.

Na década de 60, alguns pesquisadores sugeriram que o termo psicrotrófico fosse utilizado para indicar os microrganismos que eram capazes de se desenvolver à baixas temperaturas (Eddy, 1960; Witter, 1961; Morse *et al.*, 1968).

De acordo com as normas da Federação Internacional de Laticínios (Collins, 1981), as bactérias psicrotróficas foram definidas como sendo aquelas capazes de crescer a 7°C ou menos, independentemente da temperatura ótima de crescimento, ou seja, seriam aquelas capazes de se multiplicar a temperatura de refrigeração, definindo a vida-de-prateleira dos produtos armazenados nessa condição. Esse grupo é extremamente importante, principalmente em produtos conservados ou armazenados sob refrigeração por longos períodos (1 a 4 semanas). No caso do leite, o uso intensivo e continuado da refrigeração, desde a fazenda até a residência do consumidor, representa um sério problema pela possibilidade de provocar uma gradativa seleção de

psicrotróficos (Coghill e Juffs, 1979; Dufrene *et al.*, 1995.; Almeida, 1998; Gomes e Lemos, 1999).

Os microrganismos psicrotróficos constituem um grupo heterogêneo podendo incluir bactérias Gram + e Gram -, na forma de bastonetes ou cocos. São bactérias geralmente deterioradoras importantes, devendo-se destacar a capacidade de muitas delas, principalmente *Pseudomonas spp*, de produzir proteases e lipases termorresistentes, responsáveis pela deterioração do leite processado a altas temperaturas (tipo UHT), podendo ainda, eventualmente, serem patogênicas (Frank, 1997; Almeida, 1998). A literatura relata diversas pesquisas mostrando a diversidade da microbiota psicrotrófica do leite, evidenciando que é composta principalmente por bactérias dos gêneros *Pseudomonas*, *Flavobacterium* e *Alcaligenes* (Frank, 1997), além de representantes dos gêneros *Bacillus*, *Micrococcus*, *Aerococcus* e *Staphylococcus* (Collins, 1981; Schroder e Bland, 1984; Griffiths, 1990; Andersson, *et al.*, 1995). O gênero *Bacillus* constitui, segundo Meer *et al.* (1993), 83% da microbiota do leite tratado termicamente e estocado sob refrigeração; as células vegetativas são geralmente destruídas pela pasteurização, enquanto os esporos permanecem viáveis, podendo até mesmo serem ativados pelo tratamento térmico (Meer *et al.*, 1993; Andersson *et al.*, 1995 Frank, 1997).

A maioria das espécies de *Bacillus* não representa a microbiota normal do leite cru, sendo sua ocorrência relacionada principalmente às condições sanitárias inadequadas, durante o processamento e à temperatura de estocagem do leite antes da pasteurização (Matilla *et al.*, 1990). Estas bactérias podem trazer grandes prejuízos econômicos para a indústria leiteira, principalmente pela redução da vida-de-prateleira dos produtos refrigerados, com a produção de lipases e proteases termorresistentes, capazes de degradar a gordura e proteína, causando rancificação, amargor, geleificação e coagulação, tanto em leite como em produtos lácteos (Collins, 1981; Kohlmann *et al.*, 1991; Frank, 1997).

Segundo Griffiths (1990), a predominância no leite cru de bastonetes Gram negativos, não formadores de esporos e catalase positivos, está associada com a proteólise e lipólise; essas bactérias, na sua grande maioria, não são termodúricas, sendo eliminadas durante o processo de pasteurização. No entanto, embora bactérias do gênero *Pseudomonas* possam ser destruídas quando presentes em números reduzidos (10^2 UFC/mL), elas podem sobreviver quando em populações acima de 10^6 UFC/mL (Schroder e Bland, 1984).

Almeida e Furtado Filho (1993) relatam em seus estudos sobre a atividade proteolítica de 154 espécies de microrganismos isolados de leite às temperaturas de 5°, 20° e 30°C que as espécies de *Pseudomonas*, *Aerococcus* e *Alcaligenes*, todas Gram negativas, mostraram atividade proteolítica a 5°C. Griffiths (1990), em seus estudos sobre bactérias psicotróficas, sugeriu que a temperatura de crescimento tem influência na síntese de proteases e lipases extracelulares, com variação dependendo da espécie considerada, o que foi confirmado por Fairbairn e Law (1986), trabalhando com as bactérias do gênero *Pseudomonas*.

Cabe destacar que as lipases e proteases de origem microbiana não são eliminadas pelos métodos convencionais de pasteurização do leite (Zall *et al.*, 1982), sendo termorresistentes. Já a lipase natural, do leite é uma enzima termolábil, facilmente destruída pelas temperaturas de pasteurização, não causando danos à matéria graxa do leite quando manuseado e processado adequadamente, contrastando, portanto, com as lipases microbianas.

A lipólise resulta da ação das lipases (naturais ou microbianas), enzimas que tem a propriedade de hidrolizar os triglicerídeos da gordura, liberando ácidos graxos de cadeia curta (butírico, capróico, caprílico e cáprico) que, sendo voláteis, são os principais responsáveis pelo aparecimento de odores e sabores desagradáveis de ranço no leite (Gomes, 1988). Os produtos mais freqüentemente envolvidos com problema de

rancificação são o creme de leite, a manteiga, a margarina e produtos lácteos com alto teor de gordura (Goepfert *et al.*, 1972; Andersson *et al.*, 1995).

3.3. Características de *Bacillus cereus*

3.3.1. Taxonomia e Identificação

Bacillus cereus foi originalmente isolado e descrito por Frankland e Franckland, em 1887, segundo Goepfert *et al.* (1972). É uma bactéria que pertence à família *Bacillaceae*, aeróbia, esporogênica, com habitat natural no solo e vegetais.

Atualmente, o gênero *Bacillus* encontra-se descrito por Sneath, na seção 13 do vol 2 do Manual Bergey's (1986). Sua classificação é baseada no sistema de Gordon (1973) e inclui 34 espécies. Além disso, 26 espécies são listadas como espécies incertas. Desde a conclusão do Manual Bergey's (1986) um número razoável de novas espécies foi descrita, conforme Claus e Fritze (1989), citados por Stadhouders (1992) e Notermans e Batt (1998). Esses autores reportam, também, que dentro do gênero *Bacillus*, o grupo de *B. cereus* está bem caracterizado quanto à morfologia celular, à forma e localização dos esporos, além de suas propriedades fisiológicas. Estes microrganismos apresentam-se geralmente como bastonetes longos, Gram positivos, formadores de esporos, móveis por meio de flagelos peritríquios, anaeróbios facultativos e catalase - positivos. As células vegetativas apresentam diâmetro em geral de 1,0 a 1,2 μ m e comprimento de 3,0 a 5,0 μ m, esporos centrais ou paracentrais sem distender o esporângio e também algumas características bioquímicas importantes, principalmente a produção de lecitinase e incapacidade de fermentar manitol (Johnson, 1984; Stadhouders, 1992; Granum, 1997).

Segundo Goepfert *et al.* (1972) e Harmon (1992), pesquisadores como Smith *et al.* (1946, 1952), em muito contribuíram para o processo de classificação das espécies, partindo deles a proposta de divisão de um único gênero em três grupos (I, II

e III), baseado nas características morfológicas dos esporos e esporângios. Posteriormente, Gordon (1973), redistribuiu o grupo I subdividindo-o, de acordo com o tamanho de suas células vegetativas, passando as espécies *B. megaterium*, *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. mycoides* e *B. thuringiensis* a fazer parte do subgrupo IA.

A classificação do gênero, juntamente com a diferenciação das espécies, principalmente *B. cereus* e *B. thuringiensis*, é bastante discutida pelos pesquisadores, uma vez que elas diferem entre si em apenas uma única característica, podendo gerar confusão durante o procedimento de identificação. Assim sendo, a principal característica que difere *B. thuringiensis* de *B. cereus* é a capacidade daquele em produzir cristais protéicos, tóxicos para insetos; já *B. mycoides* apresenta crescimento rizóide e *B. anthracis* apresenta patogenicidade peculiar para animais. Segundo Damgaard *et al.* (1996), tanto agrupá-los em uma só espécie, a exemplo de Smith *et al.* (1946, 1952), como considerá-los espécies diferentes, como outros pesquisadores preferem, parece ser bastante polêmico, uma vez que as diferenciações são muito restritas para permitir a definição de espécies independentes.

Dessa forma, nos últimos anos, vários pesquisadores vêm testando técnicas mais precisas, principalmente métodos baseados na análise de componentes genéticos da célula, com o objetivo de aperfeiçoar a diferenciação das espécies de *B. cereus* (Harmon, 1992; Zotola, 1997; Notermans e Batt, 1998).

Segundo Preice (1993) citado por Granum (1997) e Notermans e Batt (1998), o gênero *Bacillus* está dividido em seis diferentes subgrupos, sendo *B. cereus* pertencente ao grupo de *B. subtilis*; conforme já citado, quatro espécies deste grupo são muito relacionadas: *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis* e *B. mycoides*, sendo as últimas três consideradas como subespécies de *B. cereus*, com base em propriedades fenotípicas e genéticas, (Ash *et al.* (1991) e Carlson (1994) citados por Granum (1997) e Notermans e Batt (1998).

D'Aubert *et al.*, (1980) e Rhodehamel e Harmon (1998), mencionaram que a identificação com base em testes bioquímicos é problemática, já que várias cepas da mesma espécie podem apresentar reações diversas em suas características bioquímicas, bem como em relação às propriedades sorológicas e de sensibilidade a fagos. Geralmente, a maioria das cepas de *B. cereus* utilizam glicose, frutose e trealose, mas não são capazes de degradar xilose, arabinose, galactose, sorbose, sorbitol, manitol e dulcitol (Goepfert *et al.*, 1972; Granum, 1993). A urease é produzida por algumas cepas, enquanto a grande maioria reduz nitrato a nitrito. Têm sido observadas algumas cepas que apresentam fraca atividade amilolítica, embora a regra seja a produção intensa de amilase (Shinagawa *et al.* 1992).

Apesar de suas limitações, os testes bioquímicos são ainda hoje muito utilizados, sendo que um resumo das características mais marcantes de *B. cereus* e outros membros do grupo é apresentado na Tabela 2.1, (Rhodehamel e Harmon, 1998).

Tabela 2.1 Características morfológicas culturais e bioquímicas que diferenciam espécies de *B. cereus*

Características	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Bacillus mycoides</i>	<i>Bacillus anthracis</i>	<i>Bacillus megaterium</i>
Reação de Gram	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+
Motilidade	+/- ^b	+/-	- ^c	-	+/-
Redução de nitrato	+	+/-	+	+	- ^d
Decomposição da Tirosina	+	+	+/-	- ^d	+/-
Resistência a lisosima	+	+	+	+	-
Reação gema-ovo – lecitinase	+	+	+	+	-
Utilização anaeróbia de glicose	+	+	+	+	-
Reação de VP	+	+	+	+	-
Manitol	-	-	-	-	+
Hemólise	+	+	+	- ^d	-
Crescimento rizóide	-	-	+	-	-
Produção de cristais paraesporais	-	+	-	-	-
Produção de toxinas	+	-	-	-	-

^a 90-100% cepas positivas^b 50% cepas positivas^c 90-100% cepas negativas^d maioria das cepas negativa

3.3.2. Patogenicidade de *B. cereus*

B. cereus é um patógeno oportunista de grande importância, capaz de causar diferentes tipos de infecção e intoxicação no homem.

Estudos exaustivos sobre a patogenicidade de *B. cereus*, vêm sendo realizados principalmente em relação à sua capacidade de produzir toxinas extracelulares ou fatores de virulência identificados e associados as doenças de origem alimentar (Kamat, 1986; Notermans e Batt, 1998).

A literatura reporta que, até o presente, são conhecidas sete toxinas diferentes produzidas por esse microrganismo, sendo seis delas produzidas durante o crescimento vegetativo e secretadas pelas células: a enterotoxina, responsável pelo quadro diarreico, duas hemolisinas (cereolisina e hemolisina II), três fosfolipases-C

(fosfatidil-inositol hidrólase, fosfatidil-colina hidrolase e esfingomielinase - esta também com atividade hemolítica) e a toxina emética, responsável pelo quadro com predominância de sintomas de vômitos (Granum, 1994;1997; Griffiths, 1990).

Além dos distúrbios gastrointestinais, este microrganismo pode causar diversas infecções, localizadas ou sistêmicas. A produção de toxinas e a capacidade invasiva de tecidos pode causar doenças oculares extremamente agressivas, levando à cegueira em menos de 24 horas (Goepfert et al., 1972; Kramer e Gilbert, 1989; Granum, 1994). As fosfolipases e hemolisinas produzidas podem gerar um quadro sistêmico de bacteremia, septicemia, endocardite, infecção do sistema nervoso central e do aparelho respiratório, bem como infecções oportunistas em pessoas imunodeprimidas (Goepfert et al., 1972; Kramer e Gilbert, 1989; Drobniewsk, 1993; Fermanian et al., 1994; 1996). Essas patologias são raras quando comparadas ao processo afetando o trato gastrointestinal.

- Toxina Diarréica

Diversos termos tem sido empregados para caracterizar a toxina diarréica, entre eles: agente diarreico, fator de acúmulo de fluídos, fator de permeabilidade vascular, toxina dermonecrótica, ou simplesmente enterotoxina (Johnson, 1984; Granum, 1994; 1997). Todos esses termos se referem a uma proteína, com peso molecular igual a 50 kDa e ponto isoeletrico de 4,9, produzida durante a fase exponencial de crescimento de *B. cereus*, em pH de 6.0 a 8.5, sendo ótima na faixa de 7.0 a 7.5 e temperatura entre 18° a 43°C. É uma toxina termolábil, inativada a 56°C durante 5 minutos (Ives e Potter 1977).

Spira e Goepfert (1972) observaram que a enterotoxina tem características antigênicas, é sensível à tripsina, pepsina e quimiotripsina, instável a extremos de temperatura e pH, sendo mais estável a pH 5,0 – 10,0 e com características termolábeis.

Johnson e Bonventre (1967); estudando a letalidade da toxina de *B. cereus*, observaram que esta, causa a morte de camundongos, quando injetada por via intravenosa, estimula o sistema adenilciclase, podendo contribuir para o acúmulo de fluídos, alteração de permeabilidade vascular e necrose na pele de cobaias. Acredita-se que seja composta por dois ou mais componentes, havendo a necessidade da presença de glicose para sua formação (Spira e Silverman, 1979). Pesquisas recentes tem mostrado que esta enterotoxina é uma proteína livre, sem atividade hemolítica (Granum, 1994; Day *et al.*, 1994).

Estudos recentes mostram que pelo menos duas diferentes enterotoxinas foram caracterizadas: uma é a toxina com três componentes, com atividade hemolítica e necrótica denominada de HBL (Thompson *et al.*, 1984; Beecher *et al.*, 1995) e a outra é a enterotoxina simples, estudada por Shinagawa *et al.* (1991), cujo gene codificador foi detectado por Agata *et al.* (1995a).

Ombui *et al.* (1997) encontraram evidências de que o gene BCET, em que a sequência de nucleotídeos codifica uma enterotoxina de *B. cereus* (Agata *et al.*, 1995a), não é comum a todas as cepas enterotoxigênicas. Esta descoberta levou os referidos autores a sugerirem que pelo menos duas, talvez três, enterotoxinas seriam responsáveis pela toxigênese diarréica do *B. cereus*.

Vários métodos tem sido utilizados para a detecção da toxina diarréica, sendo mais usado o da alça ligada de coelho, em que filtrados de cultura são injetados no intestino, observando-se o acúmulo de fluidos (Johnson *et al.*, 1982). Esses mesmos pesquisadores revelaram que o teste da permeabilidade vascular também é utilizado na identificação da toxina, sendo efetivado pela injeção subcutânea de filtrado de cultura na pele de cobaias, seguido de aplicação de corante “Evans Blue”; quando a reação é positiva podem-se observar manchas cinzas ou azuis na pele das cobaias.

Atualmente, para a detecção da toxina diarreica em alimentos ou cultura do microrganismo, existem dois kits comerciais disponíveis, baseados em métodos imunológicos ou imunoenzimáticos-ELISA.

O primeiro deles é o kit BCET-RPLA (Oxoid-TD 950), em que se usa a técnica de aglutinação passiva reversa em látex e detecção, segundo seus fabricantes, de 1ng/mL (Beecher e Wong, 1994).

O outro kit é o *Bacillus* “Diarrhoeal Enterotoxin-Visual Immunoassay” (BDE-VIA) da TecraTM (Bioenterprises Pty. Ltd. Roseville, NSW, Austrália), que utiliza o método de ELISA e foi desenvolvido por Burrell *et al.* (1991) para uso direto em amostras de alimentos, após simplificado o procedimento de extração. O kit Tecra detecta o antígeno 577, previamente descrito por Thompson *et al.* (1984), com limite mínimo de detecção entre 2 a 5ng/mL.

Segundo relatos de Griffiths (1990) e Van Netten *et al.* (1990), foram obtidos resultados positivos na produção de toxinas por cepas psicotróficas isoladas de leite. Baker e Griffiths (1995), relataram que eram necessárias altas contagens de *B. cereus* ($> 10^7$ /mL) para que fossem sintetizados níveis de toxinas detectáveis pelo kit.

Granum *et al.* (1993a) desenvolveram estudos para determinar a especificidade do kit baseado em RPLA. A pesquisa foi conduzida em 85 isolados de produtos de laticínios, sendo que 59% se mostraram enterotoxigênicos.

Fermanian *et al.* (1996) também compararam resultados obtidos na RPLA com testes de citotoxicidade em células CHO; verificaram que houve correlação entre os dois métodos na detecção da enterotoxina. Os referidos autores constataram também que as maiores produções de toxina ocorreram durante a fase exponencial, não tendo sido registrados resultados falso positivos.

O kit TecraTM BDE-VIA, segundo Notermans e Tatini (1993), tem um desempenho superior frente ao RPLA. Este método também foi aprovado por Dufrene *et al.* (1994), para detectar a produção de enterotoxina por cepas psicotróficas, observando-se que todas as cinco culturas testadas, as quais cresciam a 7°C, foram positivas no teste.

Christiansson (1993), comparando os kits, observou que não detectam o mesmo antígeno e relatou um limite de detecção, pelo kit TECRA, de 1 ng/mL. Day *et al.* (1994) desenvolveram estudos simultâneos com os dois kits e um método de imunodifusão em gel. Estes autores também concluíram que os dois kits não detectam o mesmo antígeno. Somente culturas apresentando vários antígenos no ensaio de imunodifusão mostraram coincidência de resultados em RPLA e BDE. Entretanto as culturas negativas no RPLA e positivas no kit TECRA apresentaram um único antígeno, o qual formava a linha de identidade com o antígeno padrão (a enterotoxina) na imunodifusão.

Estudos realizados por Beecher e Wong (1994) para identificação de antígenos pelos dois kits, mostraram que o RPLA detectou o antígeno L₂ do complexo HBL com a sensibilidade declarada pelos fabricantes (1 ng/mL), e o sistema TECRA reconheceu duas proteínas de massa 40 e 41KDa, não tóxicas. Estes estudos evidenciaram que a confiabilidade dos kits dependia de sua validação rigorosa.

Buchanan e Schultz (1992), utilizando o sistema BCET-RLPA, detectaram a presença de enterotoxina em material tratado a 80°C por 5 minutos e cuja atividade tóxica já havia sido destruída. Já Baker e Griffiths (1995) usaram o BDE-VIA para avaliar a estabilidade térmica da enterotoxina. A justificativa dos autores para o uso do TECRA é de que seu anticorpo é uma antitoxina diarréica. Segundo esses autores, os alimentos são sistemas complexos e por isso podem estar associados a aumento de termoestabilidade da enterotoxina.

Rusul e Yaacob (1995) compararam os dois kits, TECRA e RPLA, para verificar a produção de toxina em 194 cepas de *B. cereus* isoladas de alimentos, constatando que 91,8% e 84,5% foram positivas, respectivamente. Os dois kits apresentaram coincidência de resultados positivos em 155 cepas isoladas.

Existem controvérsias entre os pesquisadores em relação à maneira como se desenvolve a síndrome diarreica, principalmente se através da ingestão da toxina pré-formada no alimento, por ingestão de esporos ou células viáveis da bactéria. Alguns autores acreditam que a produção da toxina diarreica é provavelmente mais intensa no intestino do que no alimento (Buchanan e Schultz (1992), Granum *et al.*, 1993b; Shinagawa, 1993). Assim, segundo Granum *et al.* (1993a) é provável que a síndrome diarreica seja causada pela ingestão de esporos e células viáveis, presentes nos alimentos, que, pela colonização, seguida de multiplicação no intestino delgado, produziram toxina suficiente para causar a doença.

A dose infectante para ocasionar a síndrome diarreica, segundo Granum (1997), está estimada entre 10^4 a 10^5 células viáveis. Entretanto, vários pesquisadores reportam que a dose infectante oscila entre $10^5 - 10^7$ UFC/mL ou g (Kramer e Gilbert, 1989; Shinagawa, 1993; Granum, 1994; Granum, 1997). Deve-se considerar, também, a variação na susceptibilidade de cada indivíduo, segundo Granum (1994 e 1995). Os sintomas mais severos tem sido associados com atletas jovens (<19 anos) e os idosos (> 60 anos de idade).

Os sintomas provocados pela enterotoxina são muito semelhantes com aqueles causados pelo *C. perfringens*. Aparecem após o período de incubação de 8 a 16 horas, provocando dores abdominais e diarreia aquosa, acompanhados de espasmo retal e náuseas, usualmente com duração de 12 a 24 horas e normalmente não incluem vômito e febre no quadro clínico (Kramer e Gilbert, 1989; Granum, 1994; 1997).

No entanto, estudos apresentados por Granum (1997) e Rowan e Andersson (1997) relataram que não existem ainda evidências suficientes para se afirmar como ocorre realmente a síndrome diarreica. As dúvidas persistem acerca desta patogenia, uma vez que a natureza do fator tóxico não está ainda totalmente esclarecida.

O mecanismo de ação da enteroxina também é desconhecido. Kramer e Gilbert (1989) relatam que a toxina diarreica no intestino reverte a absorção de fluídos e íons (Na^+ e Cl^-), dificulta a absorção de glicose e aminoácidos, além de causar necrose e danos a mucosa. Já Sears e Kaper (1996) acreditam que a estimulação do sistema adenilatociclase-AMP-cíclico é passível de questionamento; por isso, esses autores preferiram denominá-la de “citotoxina secretória” em vez de enterotoxina, devido a resposta necrótica observada no intestino de animais.

Segundo Langeveld *et al.* (1996), a síndrome diarreica parece estar mais comumente envolvida com ingestão de alimentos ricos em proteínas. Já Garcia Arribas e Kramer (1990) acreditam que aproximadamente 75% dos surtos diarreicos estão relacionados com o consumo de alimentos contendo ingredientes amiláceos. O fato é que a literatura é vasta neste assunto e relata que existe uma diversidade muito grande de alimentos envolvidos nesse tipo de surto, incluindo carnes, produtos cárneos, vegetais, leite e derivados (muito pouco), molhos e sobremesas diversas (Goepfert *et al.*, 1972; Johnson, 1984; Kramer e Gilbert, 1989; Notermans e Batt, 1998).

- Toxina Emética

Ao contrário da toxina diarreica, bastante estudada e relatada, há uma escassez de pesquisas voltadas para a toxina emética. Talvez a razão principal seja porque, até recentemente o único modo de testar a atividade biológica dessa toxina era restrito ao uso de ensaios biológicos com macacos, dificultando a evolução dos

estudos. Atualmente os testes em células estão disponíveis e maiores informações sobre esta toxina podem ser obtidas (Shinagawa *et al.* 1992).

A toxina emética foi identificada pela primeira vez no Reino Unido nos anos 70, depois da ocorrência de vários incidentes associados ao consumo de arroz provenientes de restaurantes chineses (Kramer e Gilbert, 1989).

Os primeiros estudos concretos sobre essa toxina foram realizados pelo Laboratório Central de Saúde Pública em Londres. Melling *et al.* (1976) verificaram que filtrados de cultura de uma cepa isolada de um surto emético não causava aumento de fluídos no teste da alça ligada de coelho (LRIL) e reação de permeabilidade vascular (VPR). Estes pesquisadores estudaram a especificidade do arroz como meio de crescimento e produção de toxina por cepas eméticas.

Melling *et al.* (1978), em estudos experimentais, reportaram a resistência da toxina à temperatura de 121°C por 20 minutos, a extremos de pH, entre 2 e 11, e à exposição a tripsina e pepsina. Os autores observaram, que macacos submetidos aos testes até 16 vezes, durante oito meses, não desenvolviam resistência à toxina, o que sugeria sua baixa antigenicidade.

A toxina emética difere bastante da toxina diarreica pela sua alta estabilidade em relação a temperatura, a enzimas proteolíticas e a variações de pH. O fator tóxico não foi retido em filtros de membranas, o que permitiu avaliar seu peso molecular como sendo menor que 5KDa. Turnbull *et al.* (1979) propuseram a descrição do fator tóxico como sendo uma toxina termorresistente, de baixo peso molecular, provavelmente não protéica, elaborada durante o crescimento de *B. cereus* no arroz. Agata *et al.* (1994) verificaram e analisaram estruturalmente o fator tóxico utilizando diversos métodos para as pesquisas, entre eles a ressonância magnética nuclear, espectroscopia de massa, degradação química, etc. Estes estudos revelaram que o fator

UNICAMP

tóxico, era um dodecadepsipeptídeo, denominado “cereulídeo”, de fórmula molecular $C_{57}H_{96}O_{18}N_6$.

Mikami *et al.* (1994) caracterizaram o fator como sendo uma toxina de efeito citostático, não hemolítica, de massa estimada menor que 5KDa e resistente à altas temperaturas (121°C/20 min.).

Posteriormente, Suwan *et al.* (1995) confirmaram o cereulídeo como sendo a própria toxina emética, descrevendo-o como um depsipeptídeo com 36 aminoácidos ou oxiácidos.

Shinagawa *et al.* (1995) estudaram a relação entre o cereulídeo e o fator citostático parcialmente purificado, caracterizando-os paralelamente e testando sua atividade emética pela administração oral em macacos. Os resultados demonstraram absoluta correlação entre os dois.

Os estudos relacionados à produção da toxina emética estiveram restritos, durante a década de 70, ao uso de arroz como meio de cultura. Posteriormente, as pesquisas demonstraram que essa produção não ocorria exclusivamente nesse alimento, mesmo que fosse o veículo predominante nos surtos (Johnson, 1984; Te Giffel, 1997).

Segundo Kramer e Gilbert (1989), o nível de contaminação necessário à produção de toxina em teores suficientes para provocar vômito causaria a deterioração visível do alimento; desta forma, a maioria dos surtos que poderiam ocorrer seria evitada, uma vez que somente a toxina pré-formada determinaria a ocorrência da síndrome.

As condições para a produção da toxina emética ainda são muito pouco conhecidas. Segundo Melling *et al.* (1978), a produção é reduzida durante o crescimento de células vegetativas e a temperaturas mais elevadas. Granum *et al.* (1995), em diversos estudos, detectaram que a produção da toxina no alimento ocorria

no final da fase estacionária. Esses autores sugeriram que provavelmente a bactéria liberaria a toxina emética como forma de degradar produtos do meio em que crescia e, ao propor um sistema de classificação das toxinas relacionadas a doenças de origem alimentar, situaram a toxina emética do *B. cereus* como uma “neurotoxina sem sítio de ação conhecido”. De acordo com relatos de Sears e Kaper (1996) as neurotoxinas atuam nos neurotransmissores, gerando a resposta emética.

Agata *et al.* (1995b) ao estudar o mecanismo de ação da toxina emética, deduziram que o mesmo poderia ser mediado por antagonistas dos receptores de serotonina (5-HT₃). Quando a vagotomia e a inibição dos receptores aboliam o efeito emético, os autores verificaram que o cereulídeo causava vômito por meio de estímulo dos receptores 5HT₃ e do nervo vago aferente; o cereulídeo também ocasionou alterações na mitocôndria de células Hep-2, confirmando sua ação tóxica.

3.3.3 Epidemiologia de *Bacillus cereus*

Estudos epidemiológicos mostram o grande número de doenças de origem alimentar causadas por cepas de *B. cereus* associadas à produção das toxinas diarreica e emética (Gilbert, 1979; Johnson, 1984; Becker *et al.*, 1994)

Na Europa, onde o Sistema de Vigilância Sanitária inclui testes de identificação de *B. cereus* ao diagnosticar agentes etiológicos de “surto”, este representa uma das principais causas de doenças gastrointestinais de origem alimentar (Becker *et al.*, 1994; Simone *et al.*, 1997).

Vários surtos diarreicos foram relatados nas décadas de 50 e 60, a maioria deles em países do norte e leste europeu: Dinamarca, Rússia, Polônia, Suécia, Hungria, Itália, Alemanha, Noruega e Holanda. Na Hungria, segundo Gilbert (1979), foi a terceira causa mais comum de intoxicações alimentares na década de 60. Durante os anos de 1985 e 1989, na Holanda, 18% dos surtos foram devidos a *B. cereus*.

O primeiro surto clássico relatado envolvendo a toxina diarreica, ocorreu na Noruega e foi descrito por Hauge em 1950, citado por Johnson (1984); esse autor relata que o referido surto foi devido ao consumo de creme de baunilha, e seus sintomas apareceram após 10-12 horas da ingestão do alimento, consistindo de dores abdominais, diarreia aquosa, espasmos, náuseas, com vômitos esporádicos e febre. As amostras de alimentos foram analisadas e apresentaram contagens de *B. cereus* entre 2.5×10^7 e 1.1×10^8 UFC/g.

A partir, daí vários surtos diarreicos foram relatados em alguns países da Europa, Estados Unidos, Japão, etc. (Gilbert, 1979; Kramer e Gilbert, 1989; Brett, 1998).

Segundo Gianella (1979), em 1977 ocorreu um surto bem caracterizado, envolvendo 28 pessoas, pacientes de um hospital para portadores de doenças crônicas, associado ao consumo de carne de peru contaminada com 1.2×10^3 *B. cereus*/g. A partir desta década, vários surtos foram relatados nos Estados Unidos, apesar dos levantamentos epidemiológicos de doenças de origem alimentar serem deficientes, sendo que entre 1972 e 1982 *B. cereus* foi responsável por vários surtos ocorridos (Kramer e Gilbert, 1989).

Notermans e Batt (1998) reportam que nos Estados Unidos, de 1988 a 1992, foram relatadas um total de 2.423 surtos de doenças de origem alimentar, afetando 7.737 pessoas; 40% desses surtos tiveram sua etiologia confirmada, sendo que 21 deles foram causados por *B. cereus*, afetando 433 pessoas. Uma grande variedade de alimentos foi implicada, sendo a comida no estilo chinês a predominante. Uma deficiência nestes levantamentos é que somente quando várias pessoas são implicadas simultaneamente é que se suspeita e se relata um surto, sendo que casos individuais são geralmente negligenciados (Goepffer, 1972; Notermans *et al*, 1997; Notermans e Batt, 1998).

Dados mais recentes são mostrados por Notermans e Batt (1998); estes autores relataram que, segundo Goosen *et al.* (1987), na Holanda, durante o período de 1992 a 1994, ocorreram um total de 1543 surtos de intoxicações alimentares e 1087 casos isolados, sendo 473 desses, provocados por *B. cereus*.

Os surtos de intoxicação alimentar causado por *B. cereus* em leite são muito raros. Shinagawa (1993) reportou um grande surto ocorrido no Japão, sendo que ambas as toxinas (emética e diarreica) foram observadas nos pacientes. Segundo Notermans e Batt (1998), foram descritos cinco surtos tendo o leite como veículo: no Canadá (1 surto), na Holanda (3 surtos) e na Inglaterra (1 surto). A Tabela 2.2 relata dados qualitativos e quantitativos da incidência de *B. cereus* em alimentos.

Tabela 2.2 Incidência de *B. cereus* em diversos alimentos.

Tipo de Alimento	Positividade (%)	Contagens (UFC/g ou mL)
Arroz cru	40 – 100	$10^2 - 10^3$
Arroz cozido	12 – 93	$10^1 - 10^7$
Arroz frito	12 – 86	$10^1 - 10^5$
Leite cru	7 – 35	$10^1 - 10^2$
Leite pasteurizado	2 – 35	$10^1 - 10^4$
Creme	5 – 11	$10^1 - 10^3$
Leite em pó	15 – 75	$10^1 - 10^1$
Cereais	56	$10^2 - 10^5$
Carne crua	2 – 34	$10^1 - 10^6$
Carne cozida	22	$10^1 - 10^3$
Comida chinesa	83	$10^3 - 10^5$
Macarrão	50	10^4
Chocolate	30	$10^1 - 10^5$

Dados compilados por Notermans e Batt (1998).

Na literatura européia, surtos diarreicos provocados por *B. cereus* foram bem relatados nos últimos anos o que não ocorreu nos Estados Unidos. O único caso extensivamente estudado ocorreu em 1969, afetando 15 membros de uma comunidade que comeram bolo de carne contaminado com *B. cereus* (Midura *et al.*, 1970).

Recentemente, na Noruega, ocorreram surtos de diarreia, atribuídos a *B. cereus* (Granum, 1994). A dose infectante foi de 10^4 UFC/g de alimento, sendo que três pessoas foram hospitalizadas, uma delas permanecendo internada por três semanas. O período de incubação foi muito longo, superior a 24 horas, de forma incompatível com o que ocorre quando a toxina é pré-formada no alimento. Assim, o autor concluiu que algumas cepas podem colonizar o intestino e produzir toxina *in situ*.

Mesmo que os registros de surtos estejam associados, em sua maioria, com alimentos contaminados com populações acima de 10^6 UFC/g, não existem relatos

quanto à quantidade de alimento ingerido que poderia causar os sintomas de diarreia. (Raevuori e Genigeorgis, 1975). Hassan e Nabbut (1996), em seus experimentos com camundongos, induziram a doença com suspensões contendo 10^6 UFC/g, mas não relataram a quantidade de inóculo ministrada.

A síndrome emética é devida à produção de uma toxina no próprio alimento contaminado pelo *B. cereus* (Kramer e Gilbert, 1989; Shinagawa *et al.* 1992; Granum, 1994; Brett, 1998). Na maioria dos surtos eméticos tem sido observada alta contaminação nos alimentos, com níveis variáveis de 10^4 a 10^9 UFC/g com média de 10^7 e número de 10^9 UFC/g nas fezes dos pacientes (Gilbert, 1979; Kramer e Gilbert, 1989; Drobniewski, 1993).

A literatura reporta surtos eméticos quase sempre associados ao consumo de arroz, mas eventualmente envolvendo também outros tipos de alimentos (Shinagawa, 1993). Nos Estados Unidos, os primeiros surtos eméticos foram notificados ao Center for Disease Control (CDC) entre 1974 e 1975, envolvendo um total de 35 pessoas. No entanto, os primeiros surtos relatados e relacionados com a toxina emética ocorreram no Reino Unido, particularmente no verão e sempre associados ao consumo de arroz preparado segundo a culinária chinesa (Gilbert, 1979; Kramer e Gilbert, 1989; Shinagawa, 1993). A predominância desses surtos relacionados com comidas chinesas tem sido associada à exposição prolongada do arroz à temperatura ambiente (Gilbert, 1979; Johnson, 1984; Kramer e Gilbert, 1989; Notermans e Batt, 1998).

A partir daí, vários surtos eméticos foram relatados não só envolvendo arroz, mas também outros tipos de alimentos como, por exemplo, carne, vegetais, bacalhau, leite, macarrão, etc... (Holmes, 1981; Kramer e Gilbert, 1989; Van Netten, 1990).

Segundo levantamento epidemiológico realizado por Davey (1985) na Austrália, 23% dos surtos ocasionados por alimentos se relacionavam ao consumo de

arroz e estavam associados à forma emética de *B. cereus*. No Japão, entre 1982 e 1986 ocorreram 73 surtos de intoxicação alimentar atribuídos a *B. cereus* e 95% destes foram do tipo emético, com maior incidência no verão (Shinagawa, 1990). Este mesmo autor relata que 1991 foi o ano em que mais se registraram casos eméticos, sendo alguns atribuídos ao consumo de leite pasteurizado.

No Brasil, dados sobre doenças de origem alimentar atribuídas a *B. cereus* são muito raros. Salzberg *et al.* (1982) suspeitaram deste microrganismo como o responsável por um surto de diarreia, registrada em dois restaurantes na cidade de Campinas/SP, enquanto Passos e Kuaye (1996) em uma investigação da Vigilância Sanitária Municipal de Campinas, relataram que em 19 surtos comprovados no período de 1987 a 1993, *B. cereus* foi o agente causal em 68,4% deles.

3.4. *Bacillus cereus* na indústria de laticínios

A prática de estocagem do leite cru entre 4° e 7°C por três a quatro dias, antes do processamento, trouxe grandes benefícios às usinas de processamento, como, por exemplo, a diminuição de custos, facilidades de beneficiamento na usina e melhoria da qualidade da matéria-prima por ocasião da recepção. Por outro lado, esse armazenamento resultou em novos problemas para a indústria de laticínios, principalmente por favorecer o desenvolvimento de bactérias psicrótróficas, contaminantes usuais da matéria-prima. Entre estas, as esporuladas, especialmente as do gênero *Bacillus*, por serem termorresistentes, representam problema adicional na qualidade do leite pasteurizado.

A presença de esporulados psicrótróficos é de grande importância para a indústria de laticínios, uma vez que são responsáveis por alterações (acidificação, coagulação com baixa acidez e coagulação láctica) que ocorrem no leite pasteurizado, modificando, assim, suas propriedades quanto a cor, sabor, viscosidade etc. (Cousin, 1982; Griffiths, 1992; Collins *et al.*, 1993).

A presença de bactérias esporogênicas psicrotróficas do gênero *Bacillus* em leite cru e pasteurizado foi inicialmente reportada por Grosskopf e Harper, (1969; 1974), e, desde então, diferentes espécies têm sido isoladas desse substrato (Bodyfelt, 1980; Phillips e Griffiths, 1986; Griffiths e Phillips, 1990). Martin (1981), mostrou a prevalência de *B. subtilis*, *B. licheniformis*, e *B. cereus*. Creilly *et al.* (1994) citam que a incidência de *B. cereus* é maior durante o verão, ao passo que *B. licheniformis* predomina no período de inverno. *B. subtilis* tem sido isolado mais freqüentemente de leite esterilizado, enquanto que *B. licheniformis* é mais freqüentemente relatado em leite cru tratado termicamente.

Segundo Andersson *et al.* (1995) *B. cereus* é, atualmente, um dos principais problemas de deterioração microbiana na indústria de laticínios. Vários trabalhos relataram que se o leite não for recontaminado após a pasteurização, a sua qualidade e vida útil será determinada fundamentalmente pelo número de células ou esporos de *B. cereus* na matéria-prima. A bactéria é responsável pela denominada “coagulação doce” e pelo aparecimento de um fenômeno conhecido como “bitty cream”, além de ocasionar a formação de biofilmes nos equipamentos; seus esporos são altamente hidrofóbicos, além de produzirem “fimbrias” que facilitam a adesão à superfície de equipamentos (Zottola, 1994).

Choudhery e Mikolajcik (1970) pesquisando as alterações ocorridas em leite pasteurizado, mencionaram que a germinação dos esporos de *B. cereus* presentes no leite cru, ocorria logo após a pasteurização, indicando a sua ativação térmica; a alteração produzida pelo crescimento subsequente foi descrita como ““sweet curdling”” ou “coagulação doce” e ocorria sem que houvesse alteração do pH. Essa coagulação foi atribuída à ação de proteinases sobre a K-caseína, que era degradada o suficiente para produzir um sabor amargo no produto. O crescimento microbiano tornava-se visível através da formação de depósitos no fundo da embalagem do produto, descritas como sendo colônias da bactéria. Posteriormente, diversos estudos foram realizados sobre

UNICAMP

essas alterações provocadas por cepas psicrotróficas de *B. cereus* sendo constatado que elas também produzem fosfolipase C (lecitinase), com a degradação da membrana do glóbulo de gordura, fazendo com que a matéria graxa do leite fique exposta a ação das lipases, resultando em agregação da gordura (Cousin, 1982; Meer, 1991). Este defeito recebeu a denominação “bitty cream”.

Cepas psicrotróficas podem atingir populações excedendo 10^6 UFC/mL em leite conservado por 14 dias a 7°C; no entanto, o crescimento lento é mais comum (Mikolajcik e Simom, 1978). Resultados semelhantes foram encontrados também por Coghill e Juffs (1979) na Austrália, que reportaram crescimento de *B. cereus* psicrotrófico às temperaturas de 4° e 7°C. Diversos estudos tem sido conduzidos por vários autores quanto à presença dessa bactéria em alimentos (Gilbert, 1979; Kramer e Gilbert, 1989; Te Giffel *et al.*, 1996) e especialmente no leite (Stewart, 1975; Ahmed *et al.*; 1983; Wong *et al.*, 1988; Van Netten *et al.*, 1990; Andersson *et al.*, 1995). Estudos mais recentes de Larsen e Jorgensen (1997) na Dinamarca, demonstraram que de 458 amostras de leite pasteurizado analisadas, 56% estavam contaminadas pela bactéria.

Meer *et al.* (1991), analisando leite cru, encontraram cepas psicrotróficas de *B. cereus* em mais de 80% das amostras. Sutherland e Murdoch (1994) concluíram que *B. cereus* era a bactéria esporogênica mais importante na alteração do leite pasteurizado, estocado entre 6° e 20°C.

Na Escócia, Griffiths e Phillips (1990) detectaram *Bacillus spp* em leite, em quase 70% das amostras do produto recentemente pasteurizado, sendo que mais de 15% das culturas isoladas foram identificadas como *B. cereus*. Trabalhos realizados na Austrália (Coghill e Juffs, 1979) e nos Estados Unidos (Overcast e Atmaran, 1976; Ahmed *et al.*, 1983) também detectaram *B. cereus* em amostras de leite pasteurizado. Os últimos autores constataram níveis da bactéria entre 10 e 10^3 UFC/mL em leite pasteurizado.

Segundo Holmes *et al.* (1981), leite em pó foi a fonte de *B. cereus* em um surto emético observado nos Estados Unidos. Ahmed *et al.* (1995), relataram, em Taiwan, a contaminação de 48% das amostras de sorvete por essa bactéria. Também na China, Wong *et al.* (1987), analisaram 293 produtos de laticínios e observaram que 50% das amostras de sorvetes e 29% das de leite em pó estavam contaminadas por *B. cereus*, com população média entre 15 e 28 UFC/g. Kamat *et al.* (1987), na Índia, encontraram *B. cereus* em todas amostras de leite pasteurizado, em leite em pó, produtos lácteos e em 87% das amostras de sorvetes por eles analisadas.

Langeveld *et al.* (1996) consideraram *B. cereus* como o mais provável agente de deterioração em leite pasteurizado refrigerado, porém acreditaram serem remotas as possibilidades de, nesta situação, de causar surtos de intoxicação, diarreica ou emética.

Becker *et al.* (1994) avaliaram a presença de *B. cereus* em alimentos infantis de 17 países durante o ano de 1992; verificando que de 261 amostras analisadas, 54% estavam contaminadas pela bactéria, com níveis de até 600 UFC/g. Estes autores chamaram atenção sobre a importância da presença de *B. cereus* em alimentos infantis, em função da maior vulnerabilidade dos consumidores.

A literatura brasileira é muito escassa em relação a dados de incidência de *B. cereus* em leite pasteurizado, assim como a estudos de seu comportamento em temperaturas de refrigeração e de técnicas para o seu controle na produção de leite e laticínios. Silveira *et al.* (1989), analisando amostras de leite pasteurizado tipos A, B e C, quanto ao aspecto microbiológico, na cidade de São Paulo, encontraram *B. cereus* em 28,70% das 430 amostras analisadas. Além disso, em nosso meio, existem alguns trabalhos que relatam a ocorrência de *B. cereus* em diversos tipos de alimentos industrializados, entre eles farinhas e amidos, sopas, leite em pó, queijos, produtos desidratados, etc. (Delazzari *et al.* 1978; Leitão *et al.* 1973/74; 1987a; 1987b; Uboldi-Eiroa *et al.* 1975).

4. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL) e no Laboratório de Higiene e Legislação do Departamento de Tecnologia de Alimentos da FEA – Unicamp (SP).

4.1. Levantamento da ocorrência de cepas mesófilas e psicrótróficas de *B. cereus*, em leite comercial pasteurizado

4.1.1. Amostragem

Foram coletadas 240 amostras de leite pasteurizado dos tipos A, B, e C, de quatro marcas comerciais, no período de março à junho de 1998, em supermercados e outros estabelecimentos na cidade de Campinas, SP.

As amostragens foram efetuadas semanalmente, com a coleta de cinco unidades de amostra de cada tipo de leite (A, B e C) de uma determinada marca comercial, totalizando, portanto, 15 unidades de amostras analisadas por semana. Para cada marca comercial, as amostragens foram repetidas por quatro vezes, de forma que, ao final da coleta, foram analisadas 60 unidades de amostra de cada marca e 20 de cada tipo, num total de 240 unidades de amostras analisadas de quatro marcas comerciais diferentes durante um período de três meses de amostragem.

As amostras de leite foram coletadas em suas embalagens plásticas originais de 1000 mL, acondicionadas em caixa isotérmica, e transportadas imediatamente para o laboratório, onde foram analisadas.

4.1.2 Tratamento das amostras

No laboratório, as unidades de amostra foram repartidas assepticamente em frascos estéreis, em duas sub-unidades de amostras. Uma das sub-unidades de amostras foi submetida a choque térmico a 80°C por 10 minutos, com imediato resfriamento em banho de gelo, segundo recomendações de Crielly *et al.* (1994).

4.1.3 Contagem, isolamento e confirmação de *B. cereus*

Para a verificação da ocorrência de *B. cereus* nas amostras de leite foi utilizada a metodologia recomendada por Rhodehamel e Harmon (1998). A partir de cada sub-amostra foram realizadas diluições decimais sucessivas em solução fisiológica peptonada e efetuadas contagens de *B. cereus* por plaqueamento em superfície, espalhando-se 0,1mL do leite e de cada diluição em placas de Petri contendo ágar vermelho de fenol-gema de ovo-manitol-polimixina B (MYP), com incubação nas temperaturas de 30° e 7°C durante 24 horas e 10 dias, respectivamente, para identificação. das cepas mesófilas e psicrótróficas.

As placas selecionadas para as contagens foram aquelas que, preferencialmente, apresentaram entre 15 e 150 colônias de cor rosa e circundadas por uma zona de precipitação de lecitina, segundo Rhodehamel e Harmon (1998). No entanto, mesmo as placas contendo menos de 15 unidades formadoras de colônias (UFC) também foram consideradas nas contagens.

Para os testes de confirmação foram selecionadas, de cada placa, cinco colônias presuntivamente positivas de *B. cereus*. Quando o número de colônias era inferior a quatro, todas foram isoladas para confirmação, sendo repicadas para tubos contendo ágar nutriente inclinado e incubadas por 24h a 30°C. Numa primeira etapa da identificação, foi feita a confirmação das colônias isoladas como pertencentes ao grupo

de *B. cereus*, mediante a realização dos seguintes testes e análises, segundo Rhodehamel e Harmon (1998):

- Esfregaços de cada colônia foram preparados e corados pelo método de Gram e observados ao microscópio. Cepas apresentando características morfológicas típicas (bastonetes longos, Gram positivos, em cadeia, com esporos centrais ou subterminais sem distensão do esporângio) foram submetidas a confirmação bioquímica através dos seguintes testes:
- produção de ácido em anaerobiose, em caldo glicose vermelho de fenol;
- produção de acetilmetilcarbinol, em caldo VP;
- decomposição da tirosina, em ágar tirosina;
- redução de nitrato a nitrito, em caldo nitrato;
- crescimento em presença de 0,0001% de lisozima.

Numa segunda etapa, todos os isolados que apresentaram resultados positivos nas provas preliminares foram submetidos aos testes para a diferenciação da espécie dentro do grupo, segundo metodologia proposta por Rodhehamel e Harmon (1998):

- **Coloração de cristais paraesporais:** os isolados foram cultivados em ágar nutriente durante 7 dias, à temperatura ambiente. A seguir, foram preparados esfregaços, corados segundo metodologia recomendada por Sharif & Alaeddinoglu (1988), procurando detectar-se a eventual presença de cristais paraesporais bipiramidais, forma como se apresentam as proteínas tóxicas de *B. thuringiensis* não havendo produção das mesmas por *B. cereus* e as outras espécies no grupo.
- **Teste de motilidade:** Este teste foi realizado inoculando-se as culturas em tubos de ensaio contendo ágar motilidade para *B. cereus*, através de picada no centro do meio até a profundidade de 1cm; após incubação a 30°C/24hs, foi observado se

ocorria migração das células para as regiões fora da linha de inoculação. As cepas de *B. cereus* são geralmente móveis.

- **Teste de crescimento rizóide:** no centro de cada placa contendo ágar nutriente com a superfície bem seca, foi inoculada, com leve toque de alça de platina, cada cepa a ser identificada. Após incubação a 30°C por 48 a 72h, as colônias foram observadas, sendo consideradas positivas aquelas apresentando crescimento rizóide, espalhando-se em direção às bordas da placa. O crescimento rizóide é característico de *B. mycoides*, diferenciando de *B. cereus*, *B. anthracis* e *B. thuringiensis*.
- **Testes de atividade hemolítica:** este teste foi realizado inoculando-se culturas em placas de ágar tripticase soja-sangue. As cepas de *B. cereus* são fortemente hemolíticas, produzindo halos grandes, claros e bem nítidos de beta-hemólise, enquanto *B. mycoides* e *B. thuringiensis* são fracamente hemolíticos, produzindo halos menores ou, eventualmente, zonas de hemólise restritas à região sob a colônia. As cepas de *B. anthracis* são geralmente não hemolíticas.

As contagens de *B. cereus*, expressas em UFC/mL de leite, foram calculadas com base no percentual de colônias isoladas e testadas que apresentaram reações típicas.

Além disso, as cepas identificadas como *B. cereus* foram submetidas a testes bioquímicos adicionais preconizados por Jinbo e Kokubo (1982), (Tabela 4.1) conforme relatado por Azeredo (1998), visando diferenciar as cepas em diferentes biótipos. Foram executados os seguintes testes:

- **Hidrólise de amido:** as cepas foram cultivadas em placas de Petri contendo ágar nutriente, acrescido de 1% de amido solúvel, sendo incubadas a 30°C por 24 h. Após esse tempo as colônias foram cobertas com solução de lugol para a

observação de uma zona de transparência sob e ao redor das colônias, indicativo de hidrólise do amido; o iodo cora de azul escuro as cadeias de amido que se mantêm íntegras, não atacadas por amilase.

- **Teste de decomposição da uréia:** foi utilizado o meio de Christensen, que inclui em sua composição uréia, cuja transformação em amônia torna o meio alcalino e colorido de rosa.
- **Teste de redução de nitrato:** observou-se a capacidade da bactéria de reduzir nitrato a nitrito, conforme metodologia proposta por Rodhamel e Harmon (1998) para a confirmação de *B. cereus*.

Tabela 4.1. Caracterização de biotipos de *B. cereus*

Biotipos	Hidrólise do amido	Redução de nitrato	Decomposição de uréia
1	+	+	+
2	+	+	-
3	+	-	+
4	+	-	-
5	-	+	+
6	-	+	-
7	-	-	-

4.2. Influência do armazenamento sob refrigeração na multiplicação de cepas psicrotróficas de *B. cereus*, naturalmente presentes em leite

4.2.1. Amostragem

Foram coletadas amostras de leite pasteurizado dos tipos B e C de três diferentes marcas comerciais (I, II e III) adquiridas em supermercados e padarias na cidade de Campinas (SP).

As amostragens foram efetuadas semanalmente, sendo coletadas cinco unidades de amostra de cada tipo de leite (B e C) de uma determinada marca comercial, totalizando, portanto, dez unidades de amostras analisadas por semana. Para cada marca comercial as amostragens foram repetidas três vezes, de maneira que no final das coletas foram analisadas 30 unidades de amostra de cada marca e 15 de cada tipo de leite, perfazendo um total de 90 unidades de amostra analisadas.

As amostras de leite foram coletadas em suas embalagens plásticas originais de 1000 mL, acondicionadas em caixa isotérmica com gelo, e transportadas imediatamente para o laboratório, onde foram analisadas dentro de, no máximo, 1 hora após a coleta.

4.2.2. Procedimento experimental

No laboratório as amostras foram inicialmente homogeneizadas, separando-se assepticamente de cada uma delas uma alíquota de 500 mL. Tais alíquotas foram transferidas para frascos de vidros previamente esterilizados, a seguir, submetidas a choque térmico (75°C por 10 minutos) com imediato resfriamento em banho de gelo conforme recomendado por Dufrene (1994). Em continuação, procedeu-se à incubação a 7°C e a intervalos de 5, 10 e 15 dias efetuaram-se contagens em ágar MYP, após incubação a 30°C durante 48h, seguida de isolamento e identificação conforme descrito em 4.1.3.

4.3. Inoculação de *B. cereus* em leite, sua multiplicação e atividade deterioradora em diferentes temperaturas

4.3.1. Material

Este estudo foi conduzido mediante inoculação experimental do leite integral esterilizado com suspensões de três cepas de *B. cereus* (Bc5, Bc6, Bc7), originalmente mesófilas, isoladas de leite pasteurizado.

4.3.2. Preparo das suspensões de esporos

As culturas em estudo foram cultivadas em placas, no meio de esporulação proposto por Dufrene (1994), preparado com ágar nutriente suplementado com 50mg/l de sulfato de manganês, com incubação a 30°C durante 72 a 76h, procurando-se assegurar uma esporulação elevada, na faixa de 85 – 90%.

A seguir foram adicionadas 10mL de água destilada esterilizada a cada placa, removendo-se o crescimento com auxílio de bastão de vidro, a suspensão foi centrifugada a 5.000g por 20min a 4°C, repetindo-se o procedimento por mais 5 (cinco) vezes, conforme recomendado por Wescott *et al.* (1995).

A suspensão final, obtida pela combinação de esporos das três cepas, foi padronizada mediante contagens microscópicas com auxílio de lâmina de Petroff-Houser e também com uso da escala 1 de McFarland, procurando-se obter populações aproximadas de 10^3 esporos/mL. A seguir, a suspensão foi distribuída em tubos de ensaio estéreis e estocada sob refrigeração, a 4°C.

4.3.3. Procedimento experimental

Foram preparados frascos contendo 200mL de leite integral esterilizado a 108°C por 10 minutos. Cada frasco foi inoculado com 2mL da suspensão de esporos de *B. cereus* previamente submetida a choque térmico (75°C por 10 minutos), de acordo

com a metodologia descrita por Dufrene (1994), sendo o experimento sempre acompanhado de frascos de leite não inoculados (controle). A população verificada na primeira contagem foi estabelecida como população inicial. Posteriormente, os frascos inoculados foram incubados nas temperaturas de 5°, 10°, 15°, 20° e 30°C, sendo o leite submetido a análises variadas, a cada dois dias, durante 15 dias. Foram efetuadas as seguintes análises:

- pH, utilizando-se potenciômetro digital Micronal modelo B-374, devidamente calibrado;
- acidez titulável, utilizando metodologia preconizada pelo Instituto Adolfo Lutz (1985), por titulação com NaOH 0,1N, na presença de fenolftaleína 1% como indicador, sendo os resultados expressos em graus Dornic (°D);
- contagem total de *B. cereus* efetuada em ágar tripticase-soya (TSA), com incubação a 30°C durante 48h;
- observações gerais de alterações no leite, principalmente quanto a evidência de coagulação, geleificação e alteração de coloração.

4.4. Avaliação da possibilidade de seleção gradativa de cepas psicrotróficas de *B. cereus*, a partir de cepas originalmente mesófilas

4.4.1. Cepas utilizadas

Para este experimento foram selecionadas dez cepas, cinco das quais delas isoladas originalmente a 30°C de leite tipo B (cepas A, B, C, D e E) e outras cinco de leite tipo C (cepas F, G, H, I, e J), todas com reação de amilase positiva, juntamente com uma cepa de referência (NCTC 11145). Todas as cepas foram novamente confirmadas bioquimicamente como *B. cereus*, mediante inoculação em “Kits” de identificação API HB 50 (Biomerieux).

4.4.2. Preparo das suspensões de *B. cereus*

As suspensões foram preparadas a partir de culturas estoque, previamente confirmadas quanto à sua pureza e mantidas em ágar TSA inclinado. Por ocasião do uso, as suspensões foram padronizadas para níveis entre 10^3 e 10^4 esporos/mL, mediante contagens microscópicas em lâminas de Petroff-Houser e com base na turbidez, usando-se a escala 1 de Mc Farland. Em continuação, foram submetidas a choque térmico a 75°C durante 10 min, conforme recomendado por Dufrene et al. (1994), seguido de inoculação nas amostras de leite.

4.4.3. Multiplicação de *B. cereus* em leite incubado a 7°C

A partir de cada cultura em estudo, transferiu-se 1 mL da suspensão de esporos padronizada para tubos de ensaio contendo 9 mL de leite “longa-vida” desnatado e previamente reesterilizado a 108°C durante 10 minutos. Imediatamente após a inoculação foi realizada uma primeira contagem, correspondente ao tempo zero. Em seguida, os tubos foram incubados a 7°C durante sete dias.

Ao final desse período o leite foi submetido à primeira contagem da população de *B. cereus* e transferiu-se 1mL do leite anteriormente inoculado para um novo tubo contendo 9 mL de leite esterilizado, procedendo-se, uma incubação adicional a 7°C por mais sete dias para uma segunda contagem. Este mesmo procedimento foi repetido por mais três vezes para todas as culturas em estudo, totalizando, portanto, quatro transferências a intervalos de sete dias e um período total de 28 dias de incubação a 7°C .

Toda as contagens de *B. cereus* foram efetuadas pela técnica de espalhamento superficial em ágar TSA, com incubação a 30°C durante 48h, expressando-se os resultados em UFC/mL.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

4.5. Avaliação da capacidade de produção de enterotoxina por cepas de *B. cereus* isoladas de leite.

4.5.1. Cepas utilizadas

Os testes foram conduzidos com 12 cepas de *B. cereus* isoladas originalmente de amostras de leite comercial pasteurizado, todas amilase-positiva característica usual em cepas produtoras de enterotoxina. Como controle positivo, foi utilizada, além da cepa do próprio kit, uma cepa de *B. cereus* (NCTC 11145) de referência, produtora de toxina diarreica.

4.5.2. Procedimento experimental

As cepas selecionadas, juntamente com as de referência, foram previamente avaliadas quanto à capacidade de produção de enterotoxina em meio de cultura e na temperatura ótima de incubação.

Para tanto, foram ativadas por estrias em ágar infusão de cérebro e coração (ágar BHI) e incubadas a 30°C durante 24h. A seguir, uma alçada de cada cultura foi inoculada em 10 mL de caldo BHI, suplementado com 0,1% de glicose, incubando-se a 30°C durante 18h, conforme recomendado por Odumeru et al. (1997). Em continuação, as suspensões foram submetidas a centrifugação (3.000g, 5°C) durante 10min. Em seguida removeu-se o sobrenadante com ajuste do pH a 7 – 8, utilizando-se 5 mL para os testes de detecção de enterotoxina diarreica.

Estes testes foram efetuados utilizando-se o kit “*Bacillus* Diarrhoeal Enterotoxin – Visual Immunoassay” (BDE – VIA) produzido pela TECRA (Bioenterprises Pty. Ltd., Roseville, NSW, Austrália).

Todas as culturas em análise que evidenciaram resultados positivos no teste de produção de enterotoxina diarreica em caldo BHI foram testadas para avaliar seu comportamento no leite. Para isso, partindo-se de culturas mantidas em ágar BHI inclinado, inocularam-se tubos contendo 10mL de leite UAT/UHT reesterilizado a

108°C durante 10min. Para cada cultura em estudo, utilizou-se o seguinte protocolo de temperatura e tempo de incubação:

Temperatura (°C)	Período de incubação (dias)
30	1
20	3
15	10
10	10
5	12

Após os prazos definidos de incubação, as amostras inoculadas de leite foram testadas quanto a presença de enterotoxina diarréica, novamente utilizando-se a metodologia experimental recomendada pela TECRA.

Em todos os ensaios foram utilizadas como controle positivo tubos inoculados com *B. cereus* de referência (NCTC 11145) e outros tubos com as cepas que acompanharam o kit. Como controle negativo foram submetidos tubos não inoculados de leite esterilizado.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Levantamento da ocorrência de cepas mesófilas e psicrotróficas de *B. cereus*, em leite comercial pasteurizado

Seguindo a metodologia descrita por Rhodehamel e Harmon (1998), foram isoladas 674 cepas típicas de *B. cereus*, em ágar MYP, obtidas a partir de amostras de leite pasteurizado tipos A, B e C; preliminarmente as cepas típicas presuntivas foram submetidas a testes morfo-tintoriais e bioquímicos para confirmação da sua inclusão no grupo de *B. cereus* obtendo-se os resultados descritos na Tabela 5.1.

Tabela 5.1: Caracterização das cepas típicas, isoladas de amostras de leite pasteurizado, quanto aos testes morfo-tintorias e bioquímicos, para inclusão no grupo de *B. cereus*

Tipos de Leite	Cepas típicas	Coloração de Gram		Fermentação da glicose		Teste de VP		Decomposição da tirosina		Cepas confirmadas	
		Nº	+(%)	Nº	+(%)	Nº	+(%)	Nº	+(%)	Nº	+(%)
A	54	54	100	54	100	54	100	37	68,5	37	68,5
B	242	227	93,8	193	79,7	154	63,6	119	49,2	108	44,6
C	378	276	73,0	199	52,6	199	52,6	191	50,5	187	49,5
Total	674	557	82,6	445	66,0	347	51,5	300	44,5	332	49,2

Com bases nos resultados obtidos, 332 (49,2%) cepas típicas isoladas em ágar MYP foram confirmadas como pertencentes ao grupo de *B. cereus*. Em continuação, estas cepas foram identificadas a nível de espécie, segundo Rhodehamel e Harmon (1998), conforme resultados constando na Tabela 5.2.

Tabela 5.2. Caracterização das cepas confirmadas no grupo de *B. cereus* quanto aos testes para a diferenciação a nível de espécie.

Tipos de leite	Cepas confirmadas	Motilidade		Ausência de cresc. rizóide		Atividade hemolítica		Ausência de cristais		Cepas confirmadas	
		Nº	+(%)	Nº	+(%)	Nº	+(%)	Nº	+(%)	Nº	+(%)
A	37	37	100	34	91,9	32	86,5	32	86,5	32	86,5
B	108	105	97,2	101	93,5	104	96,3	104	96,3	101	93,5
C	187	179	95,7	177	94,6	174	93,0	174	93,0	174	93,0
Total	332	321	96,7	312	94,9	310	93,4	310	93,4	307	92,5

Os resultados obtidos permitiram concluir que do total de 332 cepas confirmadas no grupo de *B. cereus*, 307 (92,5%) foram identificadas como pertencentes à espécie *B. cereus*. É interessante observar que 12 das cepas isoladas (3,6%) foram identificadas como *B. thuringiensis* (Figura 5.1), o que não é usual em leite pasteurizado. A esse respeito, Crielly *et al.* (1994), no Reino Unido, estudando a flora de *Bacillus* em leite cru e pasteurizado, constataram que os microrganismos mais freqüentemente isolados foram *B. licheniformis*, *B. cereus*, *B. circulans*, *B. firmus*, *B. subtilis*, *B. coagulans*, *B. mycoides*, ao lado de bastonetes Gram-negativos e cocos Gram-positivos.

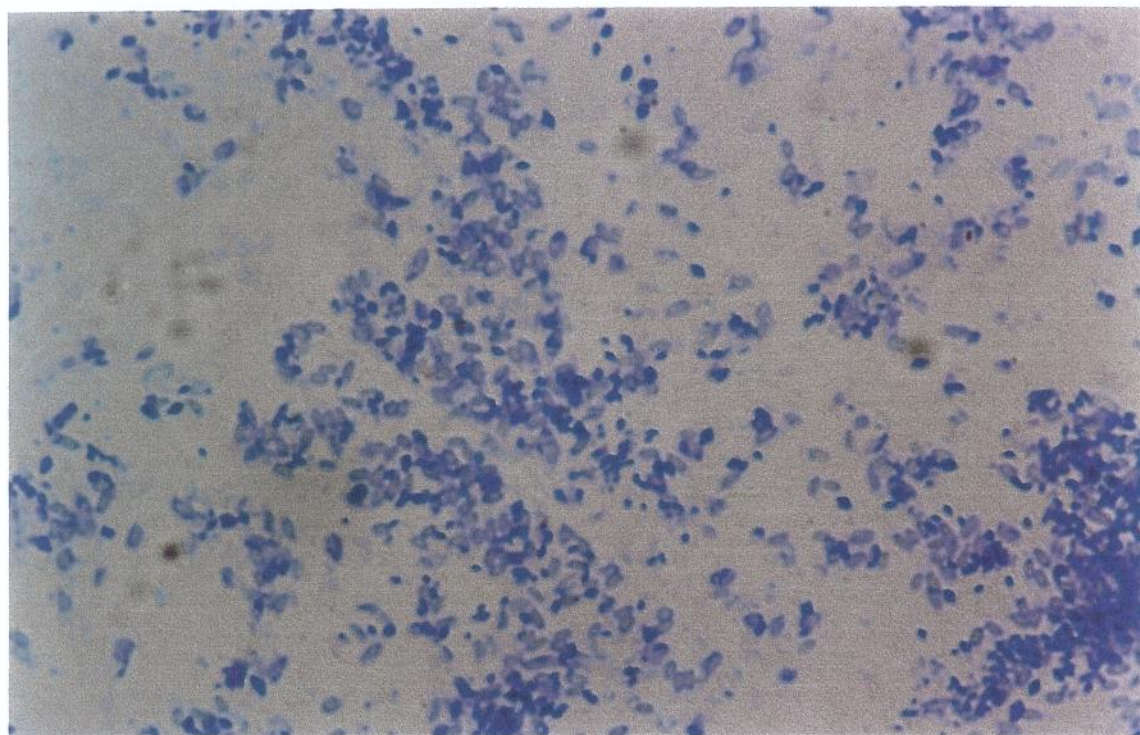


Figura 5.1 Cristais paraesporais de *Bacillus thuringiensis* (corados pelo método de Shariff, 1988)

As culturas confirmadas como *B. cereus* foram ainda submetidas a testes bioquímicos adicionais, procurando classificá-las em diferentes biotipos, conforme proposto originalmente por Jinbo e Kokuko (1982), citado por Azeredo, 1999. De acordo com esses autores, as diferentes cepas podem ser classificadas em 6 biotipos diversos (seção 4.1, Tabela 4.1), com base nas reações de hidrólise de amido, redução de nitrato e decomposição da uréia. Esses autores propuseram um esquema simples de biotipagem em que as cepas de *B. cereus* poderiam ser identificadas a partir da incapacidade de hidrolisar o amido, procurando relacionar o biotipo com a capacidade de produção de enterotoxina, constatando que esse esquema apresenta grande potencial de uso epidemiológico, ajudando a separar as cepas eméticas (amilase-negativa) das cepas diarreicas (amilase-positiva).

Os resultados caracterizando os diferentes biotipos de acordo com essa classificação, encontram-se na Tabela 5.3.

Tabela 5.3. Biotipos de *B. cereus* nas amostras comerciais de leite

Tipos de leite	Cepas isoladas	Biotipos							
		1		2		6		*NC	
		Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
A	32	0	0	29	90,6	2	6,2	1	3,1
B	101	3	3,0	83	82,2	9	8,9	6	5,9
C	174	4	2,3	145	71,8	12	6,9	13	7,5
Total	307	7	2,3	257	83,7	23	7,5	20	6,5

*Não Caracterizado

De acordo com características apresentadas na Tabela 4.1 as cepas foram classificadas nos biótipos 1, 2 e 6 (Tabela 5.3) sendo que os biótipo 1 e 2 representando 86% dos isolamentos apresentaram reação amilase +. Verificou-se, também, que 6,51% dos isolados não se enquadraram na classificação proposta por Jinbo e Kokubo (1982) citado por Azeredo (1998). Os resultados obtidos foram semelhantes aos de Azeredo (1998) que também classificou cepas isoladas de arroz, constatando predominância do tipo 2, ou seja, cepas amilase-positivas, redutoras de nitrato e não produtoras de urease.

Com base nos testes confirmativos para a identificação de *B. cereus*, os resultados obtidos no levantamento realizado sobre a ocorrência desta bactéria em leite pasteurizado, independentemente da marca, estão apresentados na Tabela 5.4.

Tabela 5.4 Ocorrência de *B. cereus* em amostras de leite pasteurizado A, B e C

Tipo de leite	Amostras analisadas	Amostras contaminadas	
		Nº	%
A	80	22	27,5
B	80	40	50,0
C	80	54	67,5
Total	240	116	48,3

Das 240 amostras analisadas, 116 (48,3%) foram positivas para *B. cereus*, verificando-se uma variação acentuada na ocorrência desse microrganismo em função do tipo de leite, com as maiores incidências ocorrendo nos leites tipos B e C, que apresentaram, respectivamente, 50% e 67,5% das amostras contaminadas. A menor incidência ocorreu no leite tipo A, com 27,5% de amostras contaminadas. Essas diferenças na ocorrência se devem, provavelmente, às melhores condições de higiene na ordenha e a refrigeração da matéria-prima, vigentes na produção de leite tipo A, o que contribui para a redução da contaminação e para o controle da multiplicação dos microrganismos eventualmente presentes.

Os resultados apresentados no presente trabalho, comparados com dados de outros autores, merecem maiores considerações. Assim, Ahmed *et al.* (1983), em Madison, nos Estados Unidos, estudando a ocorrência de *B. cereus* em leite e derivados, constataram que, de 100 amostras de leite pasteurizado analisadas, 35 (35%) foram positivas para esse microrganismo. Já Griffiths (1992), no Canadá, avaliando 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. Odumerum *et al.* (1997), também no Canadá,

analisaram 43 amostras de leite pasteurizado e constataram a presença da bactéria em todas as amostras analisadas.

No Brasil não existem muitos trabalhos voltados para o estudo de *B. cereus* em leite pasteurizado, com exceção do desenvolvido por Silveira *et al.* (1989), em São Paulo, que constataram a presença do microrganismo em 42 (10%), entre 405 amostras de leite pasteurizado.

Na Europa, onde a ocorrência de *B. cereus* é relatada com muita frequência, os índices de contaminação são mais elevados. Por exemplo, Te Giffel *et al.* (1996), na Holanda, avaliando a contaminação por *B. cereus* em leite pasteurizado, verificaram que, de um total de 157 amostras analisadas, 56 (36%) apresentavam resultados positivos para este microrganismo. Os mesmos pesquisadores, no ano seguinte, também na Holanda, pesquisando a incidência de *B. cereus* em leite pasteurizado mantido em refrigeradores domésticos, verificaram que em um total de 334 amostras analisadas, 133 (40%) estavam contaminadas pelo microrganismo (Te Giffel *et al.* 1997).

Por outro lado, Larsen & Jorgensen (1997), na Dinamarca, observaram que em 458 amostras de leite pasteurizado, 258 (56%) continham esse microrganismo. Portanto, os resultados, aqui reunidos, obtidos de diversos autores, evidenciaram índices de contaminação oscilando entre 36 e 56% os quais não divergem do que foi constatado nesta pesquisa.

As Tabelas 5.5, 5.6 e 5.7 mostram a distribuição da microbiota de *B. cereus* em leite pasteurizado tipos A, B, e C, de diferentes marcas comerciais em que o nível médio de contaminação foi de 48%.

Tabela 5.5: Contagens totais e de esporos de *B. cereus* em leite pasteurizados tipo A, de diferentes marcas comerciais (UFC/mL)

Marca comercial	Amostras analisadas	Total				Esporos*			
		< 10		10 ———— 10 ²		< 10		10 ———— 10 ²	
		Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
I	20	16	80,0	4	20,0	13	65,0	7	35,0
II	20	15	75,0	5	25,0	12	60,0	8	40,0
III	20	18	90,0	2	10,0	17	85,0	3	15,0
IV	20	17	85,0	3	15,0	16	80,0	4	20,0
Total	80	66	82,0	14	17,5	58	72,5	22	27,5

* Amostras submetidas previamente a choque térmico a 80°C durante 10 min

Tabela 5.6: Contagens totais e de esporos de *B. cereus* em leite pasteurizado tipo B, de diferentes marcas comerciais (UFC/mL)

Marca Comercial	Amostras analisadas	Total										Esporos*									
		< 10		10 — 10 ²		10 ² — 10 ³		10 ³ — 10 ⁴		< 10		10 — 10 ²		10 ² — 10 ³		10 ³ — 10 ⁴					
		Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
I	20	13	65,0	7	35,0	-	-	-	-	8	40,0	11	55,0	1	5,0	-	-	-	-	-	-
II	20	14	70,0	4	20,0	-	-	2	10,0	7	35,0	3	15,0	8	40,0	2	10,0	-	-	-	-
III	20	16	80,0	3	15,0	1	5,0	-	-	14	70,0	-	-	4	20,0	2	10,0	-	-	-	-
IV	20	15	75,0	3	15,0	2	10,0	-	-	11	55,0	5	25,0	4	20,0	-	-	-	-	-	-
Total	80	58	72,5	17	21,3	3	3,8	2	2,5	40	50,0	19	23,8	17	21,3	4	5,0	-	-	-	-

*Amostras submetidas previamente a choque térmico a 80⁰C durante 10 min

Tabela 5.7: Contagens totais e de esporos de *B. cereus* em leite pasteurizado tipo C, de diferentes marcas comerciais (UFC/mL)

Marca comercial	Amostras analisadas	Total										Esporos*									
		< 10		10 — 10 ²		10 ² — 10 ³		10 ³ — 10 ⁴		< 10		10 — 10 ²		10 ² — 10 ³		10 ³ — 10 ⁴		10 ⁴ — 10 ⁵		Nº	%
		Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%		
I	20	11	55,0	3	15,0	5	40,0	1	5,0	9	45,0	7	35,0	4	20,0	-	-	-	-	-	-
II	20	15	75,0	5	25,0	-	-	-	-	9	45,0	5	25,0	2	10,0	-	-	4	20,0	4	20,0
III	20	4	20,0	4	20,0	2	10,0	10	50,0	8	40,0	2	10,0	2	10,0	7	35,0	1	5,0	1	5,0
IV	20	7	35,0	-	-	1	5,0	12	60,0	6	30,0	1	5,0	6	30,0	6	30,0	1	5,0	1	5,0
Total	80	37	46,3	12	15,0	8	10,0	23	28,8	32	40,0	15	18,8	14	17,5	13	16,3	6	7,5	6	7,5

* Amostras submetidas previamente a choque térmico a 80°C durante 10 min

Estes resultados permitem algumas considerações importantes. De início, fica evidente a diversidade nos valores qualitativos e quantitativos relativos à presença de *B. cereus* nas amostras de leite, de acordo com o tipo. Os resultados mostraram, invariavelmente, índices menores de ocorrência e populações mais reduzidas de *B. cereus* nas amostras de leite tipo A comparativamente às do tipo B e principalmente do tipo C. Assim, enquanto no tipo A nenhuma amostra apresentou contagens iguais ou superiores a 10^2 UFC/mL, nas dos tipos B e C estes valores foram ultrapassados por 50% e 41% das amostras, respectivamente. Outra observação importante é que, em geral, as contagens de esporos de *B. cereus* foram mais elevadas que as contagens totais das amostras (células vegetativas mais esporos) não submetidas a choque térmico prévio. Este fato, aparentemente contraditório, é indicativo da importância do choque térmico na ativação dos esporos dormentes, que apenas germinam após serem submetidos ao processo de tratamento pelo calor. Por outro lado, não pode ser descartada a hipótese das amostras de leite conterem uma predominância de esporos, os quais, não germinaram totalmente no meio de cultura, sem choque prévio.

Trabalhos realizados por Andersson *et al.* (1995), Husmark e Ronner (1990) e Zotolla (1994) revelaram que os esporos de *B. cereus* são altamente hidrofóbicos, possuem fimbrias que facilitam a adesão às superfícies e consequentemente tendem a formar biofilmes na superfície dos equipamentos.

O solo é o principal reservatório e veículo disseminador de *B. cereus*, embora, eventualmente, seja encontrado em outros ambientes e alimentos. Segundo Stumbo (1973) 1 g de solo chega a conter 10^5 esporos, o que deixa evidente que o contato com o solo durante a ordenha, manuseio incorreto e o uso de equipamentos mal higienizados seriam os principais responsáveis pela presença de *B. cereus* no produto final. Finalmente, deve-se considerar que no processo de pasteurização comercial do leite, efetuado a $70^{\circ}\text{--}75^{\circ}\text{C}$ durante 15 segundos, as células vegetativas dos microrganismos, exceto alguns termodúricos, são destruídas. Dessa forma, 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 crescimento no leite; ou então, à recontaminação do produto pós-pasteurização por células ou esporos aderidos aos equipamentos e formando biofilmes.

Os resultados obtidos na presente pesquisa foram ainda analisados procurando-se detectar diferenças estatisticamente significativas nas contagens de *B. cereus* nas amostras de diferentes marcas comerciais. A Tabela 5.8 apresenta os resultados obtidos.

A análise dos resultados evidência que nos leites tipos A e C não ocorreram diferenças significativas entre as diferentes marcas nas contagens médias de *B. cereus*. O mesmo não ocorreu para o tipo B, que mostrou diferenças significativas entre as marcas, o que sugere a desuniformidade nas práticas de higiene adotadas em diferentes indústrias.

Tabela 5.8 Contagens médias* de *B. cereus* em leite pasteurizado de diferentes tipos e marcas comerciais.

Tipo de leite	Marca comercial	Nº de Observações	Mínimo	Máximo	Média	D.P.
A	I	07	1,00	1,30	1,16 a**	0,15
	II	08	1,00	1,30	1,08 a	0,14
	III	03	1,00	1,30	1,10 a	0,17
	IV	04	1,00	1,48	1,12 a	0,24
B	I	12	1,00	1,95	1,47 c	0,30
	II	13	1,23	3,83	2,63 ab	0,72
	III	06	2,38	3,99	2,92 a	0,57
	IV	09	1,30	3,66	2,04 bc	0,74
C	I	11	1,00	3,94	2,57 a	0,91
	II	11	1,00	5,71	2,88 a	1,74
	III	16	2,80	3,68	3,27 a	0,27
	IV	16	2,11	4,17	3,42 a	0,62

* log UFC/mL de leite

** Os valores com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$)

DP= Desvio Padrão

5.2. Influência do armazenamento sob refrigeração na multiplicação de cepas psicrotróficas de *B. cereus* naturalmente presentes em leite

Em nenhuma das amostras analisadas, independentemente da marca comercial e do tipo de leite, foi constatada a presença de cepas psicrotróficas de *B. cereus*.

Estes resultados diferem, bastante, dos relatados por outros pesquisadores em países europeus. Assim, Goghill e Juffs (1979), na Austrália, detectaram cepas de *Bacillus* psicrotróficos, em 3% de 167 amostras de leite pasteurizado analisadas, incluindo *B. cereus* entre as espécies isoladas e identificadas. Relato de cepas psicrotróficas de *B. cereus* também foram feitas por Crielly *et al.* (1994), no Reino Unido, Sutherland e Murdoch (1994) na Escócia, Dufrene *et al.* (1994) na Bélgica, Te Giffel *et al.* (1997) na Holanda, Berry e Foegeding (1997) na Carolina do Norte.

Van Netten *et al.* (1990), na Holanda, avaliando a ocorrência de estirpes psicrotróficas em 483 amostras de leite pasteurizado, detectaram sua presença em 39 (8%) das amostras analisadas. Resultados muito acima destes foram detectados por Larsen e Jorgensen (1997) na Dinamarca, que de 458 amostras de leite pasteurizado analisadas, encontraram cepas psicrotróficas de *B. cereus* em 257 (56%) delas.

A esse respeito, na pesquisa desenvolvida por Väisänen *et al.* (1991) na Austrália, cepas de *B. cereus* isoladas de uma planta produtora de leite UHT e de produtos submetidos a este tipo de tratamento térmico, evidenciaram temperaturas mínimas de crescimento acima de 10°C, ao passo que as isoladas de leites refrigerados eram capazes de crescer abaixo de 10°C; estes autores concluíram que as condições de produção e manutenção constante sob refrigeração favoreciam a proliferação e colonização do leite por cepas de *B. cereus* psicrotróficas.

No Brasil, não existem dados a respeito de cepas psicrotróficas de *B. cereus* isoladas de leite. É possível que as condições climáticas prevalentes em nosso meio, aliadas às deficiências na continuidade da cadeia de refrigeração, desde a produção da matéria-prima até a comercialização final do leite pasteurizado, sejam em grande parte, responsáveis pelos resultados obtidos.

5.3. Inoculação de *B. cereus* em leite, sua multiplicação e sua atividade deterioradora em diferentes temperaturas

A influência da temperatura de incubação na deterioração do leite por *B. cereus* foi avaliada através de inoculação experimental das amostras, seguido de incubação a diferentes temperaturas (5°, 10°, 15°, 20° e 30°C), sendo os resultados apresentados na Tabela 5.9 e na Figura 5.2.

Tabela. 5.9 Crescimento de *B. cereus* em leite incubado em diferentes temperaturas

Temperatura de incubação (°C)	Contagens (logUFC/mL) em diferentes períodos (dias)							
	0	2	4	6	8	10	12	14
5	3,12	3,09	2,39	2,00	NC	NC	NC	NC
10	3,14	4,26	5,66	6,50	7,70	6,66	6,21	6,05
15	3,07	7,08	7,74	8,88	9,03	9,19	8,41	7,55
20	3,29	7,02	7,79	9,19	9,72	9,28	8,57	7,32
30	3,51	6,54	8,33	8,53	9,19	9,45	8,19	7,70

NC = não houve crescimento

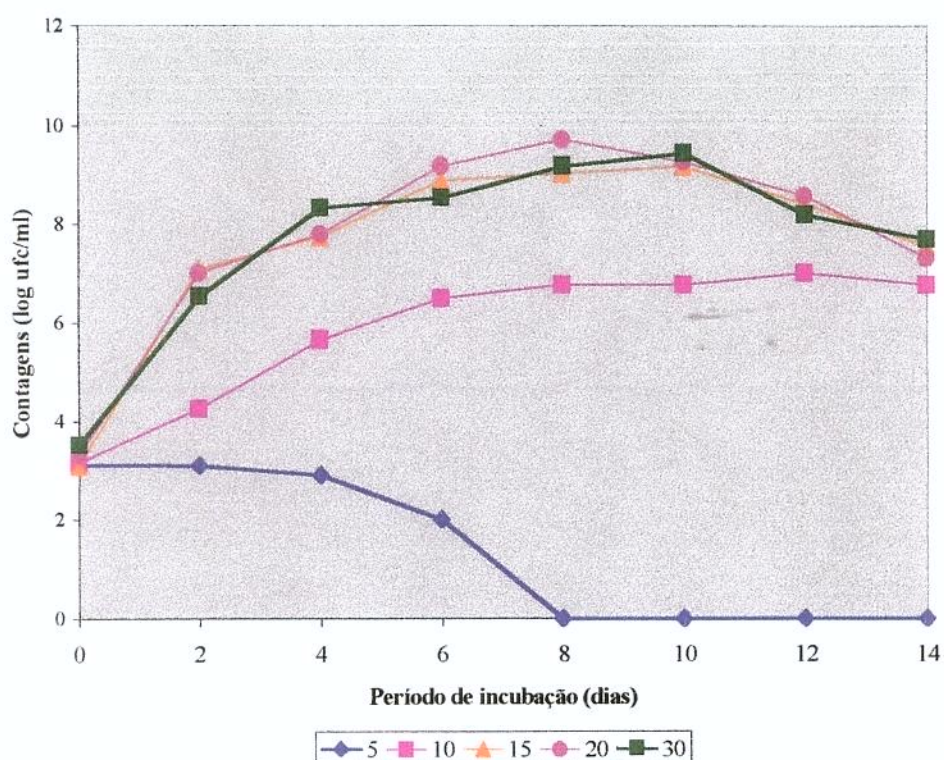


Figura 5.2 Crescimento de *B. cereus* em diferentes condições de tempo e temperatura

O gráfico apresentado na Figura 5.2 evidencia claramente que as cepas originalmente mesófilas, inoculadas no leite, não apresentaram crescimento na temperatura de 5°C durante todo o período de incubação do leite. Esta constatação foi confirmada pela avaliação do leite mantido incubado a essa temperatura durante 14 dias. Conforme se observa na Figura 5.3, a inoculação do leite com 3 cepas diferentes de *B. cereus* não determinou alterações visuais em suas características. Estes resultados divergem dos relatados por outros pesquisadores (Coghill e Juffs, 1979; Meer, 1991; Sutherland e Murdoch, 1994; Väisänen *et al.* 1994), principalmente em países escandinavos, de clima temperado, em que se constatou a presença usual de cepas psicrotróficas de *B. cereus* em leite, provocando sua deterioração mesmo quando mantido sob refrigeração. É provável, que em nosso meio, prevaleçam cepas mesófilas

no ambiente industrial, daí a ausência de crescimento no leite, incubado por períodos relativamente curtos, à temperatura de refrigeração.

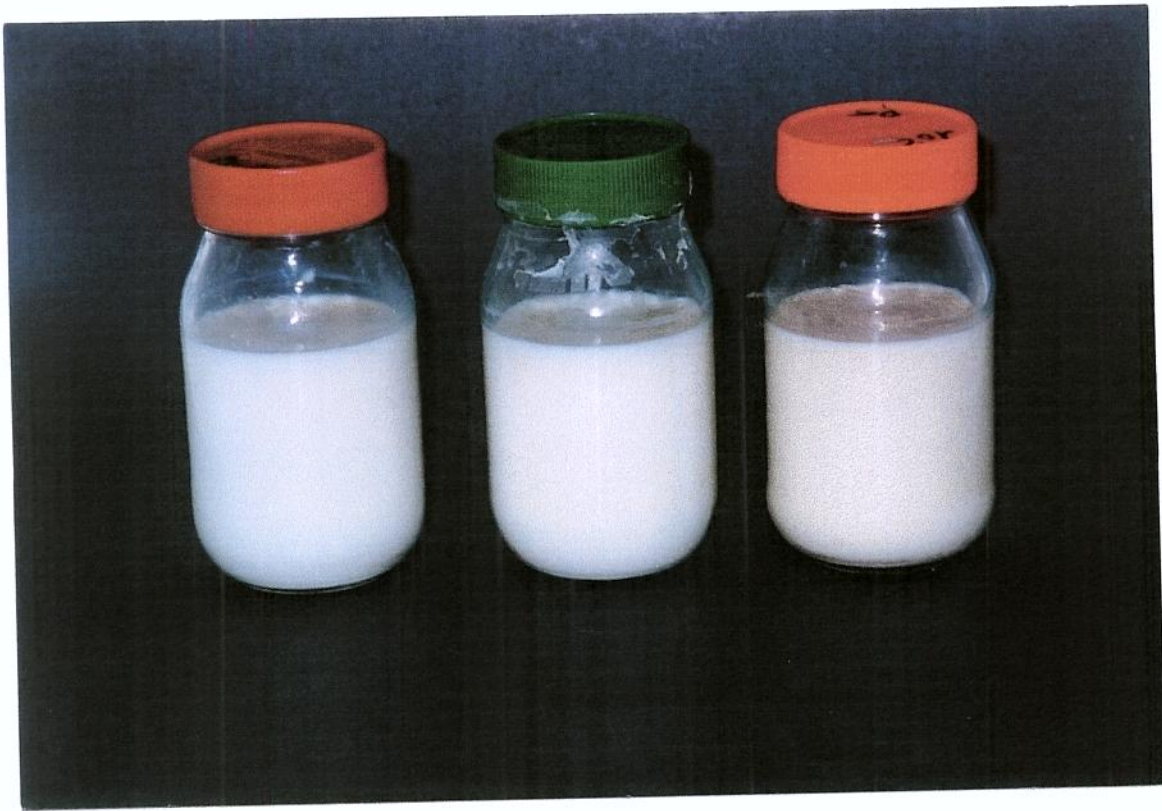


Figura 5.3 Leite inoculado com *B. cereus* e incubado a 5° C pelo período de 14 dias.

Quando o leite foi mantido em temperaturas ambientais (20° e 30°C) as populações de *B. cereus* atingiram rapidamente contagens na faixa de 10^7 UFC/mL, levando à deterioração do produto já no segundo dia de incubação (Figuras 5.4 a, 5.4 b, 5.4 c e 5.4 d). Essa deterioração foi caracterizada pela coagulação, seguida de nítida separação de fases, sem evidências de produção de gases. Ao lado das observações quanto ao aspecto, as amostras também foram caracterizadas em relação às variações de pH e acidez total, conforme Tabela 5.10.



Figura 5.4 a Leite inoculado com *B. cereus* incubado a 20°, 15° e 10°C (da esquerda para direita) – 2º dia de incubação



Figura 5.4 b Leite inoculado com *B. cereus* incubado a 20°, 15° e 10°C (da esquerda para direita) – 4º dia de incubação

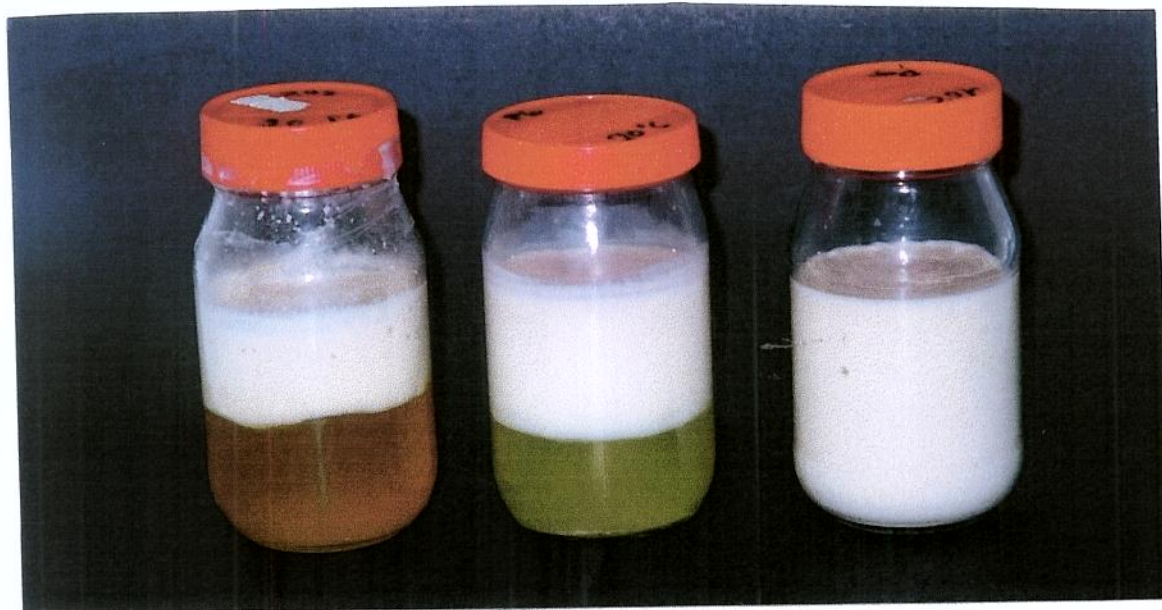


Figura 5.4 c Leite inoculado com *B. cereus* incubado a 20°, 15° e 10° C (da esquerda para direita) – 6º dia de incubação



Figura 5.4 d Leite inoculado com *B. cereus* incubado a 20°, 15° e 10° C (da esquerda para direita) - 8º dia de incubação

Tabela 5.10 Variações do pH e acidez titulável do leite inoculado experimentalmente e incubado a diferentes temperaturas

Temperatura de incubação °C	Determinações	Resultados após diferentes períodos de incubação (dias)							
		0	2	4	6	8	10	12	14
5	pH	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5
	Acidez titulável	22,8	22,2	22,3	22,8	23,7	23,4	23,1	23,4
10	pH	6,4	6,5	6,5	6,5	6,5	6,4	6,4	6,4
	Acidez titulável	22,8	22,2	22,3	22,8	23,7	23,4	23,1	23,4
15	pH	6,5	6,5	6,2	6,3	6,3	6,2	6,2	6,0
	Acidez titulável	22,0	23,4	23,1	23,7	23,4	23,7	21,4	24,3
20	pH	6,5	6,5	6,2	6,3	6,3	6,2	6,2	6,0
	acidez titulável	22,3	24,3	25,5	24,3	30,8	30,6	27,4	27,3
30	pH	6,5	6,5	6,3	6,4	7,2	7,2	7,3	7,3
	acidez titulável	23,8	27,1	34,0	33,7	22,7	24,1	22,7	24,1

Os resultados das análises de pH e acidez titulável (Tabela 5.10) foram coerentes com a ausência de alterações nas amostras incubadas a 5°C, e com os resultados das contagens, já que não ocorreu multiplicação de *B. cereus* nesta temperatura. Porém, a partir de 10°C e, principalmente a 15°C temperaturas em que o crescimento de *B. cereus* foi evidente, já se notavam alterações. Embora os resultados das análises tenham mostrado algumas variações de difícil explicação, alguns aspectos ficaram claramente evidenciados:

- De início, *B. cereus*, em seu desenvolvimento, não produz alterações marcantes nos níveis de acidez total e no pH; os resultados mostraram que mesmo nas amostras já em processo de deterioração os valores de pH reduziram-se, no máximo, em 0,5 unidade, sendo que a 30°C, temperatura ótima para a bactéria, observou-se uma tendência para a alcalinização do meio, atingindo-se valores na faixa de pH 7,0-7,3. É provável que esta elevação seja decorrente da produção de compostos nitrogenados de caráter básico, em consequência da atividade proteolítica da bactéria.
- Os valores de acidez total (°D), também não revelaram aumentos muito acentuados, comprovando que, em função do desenvolvimento de *B. cereus*, não se atingiram valores de acidez e pH que possibilitassem a coagulação da caseína, cujo pontoisoelétrico em pH entre 4,6 e 4,7. É um fato reconhecido que o *B. cereus* provoca alterações marcantes no leite, principalmente envolvendo processos de geleificação e aumento de viscosidade, provocados pela hidrólise da caseína do leite.

Estas alterações, não acompanhadas de variações no pH, são descritas como um processo de “coagulação doce”. Este processo já foi descrito por vários autores, entre eles Overcaster (1974), Bodyfett (1980) e Griffiths (1990), que analisando amostras de leite, constataram a evidência desse efeito após períodos variáveis de incubação, oscilando entre 8 e 20, dias sob temperaturas de refrigeração, entre 5° e 9°C.

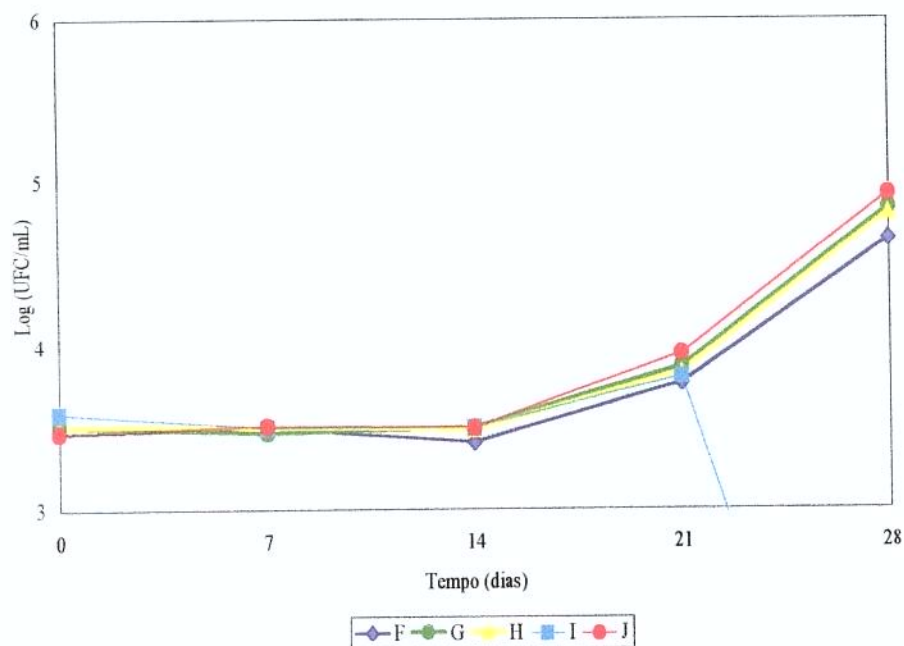
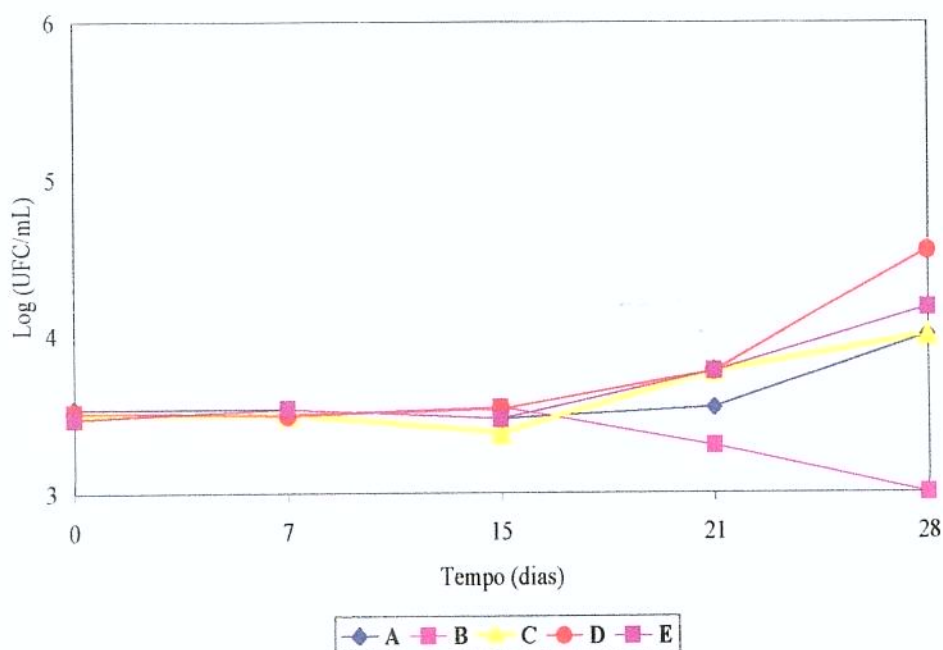
Na presente pesquisa, alterações desta natureza somente foram evidenciadas nas amostras incubadas em temperaturas acima de 10°C, geralmente após o sexto dia de incubação, quando as populações de *B. cereus* oscilavam entre 10⁶ e 10⁸ UFC/mL.

5.4. Avaliação da possibilidade de seleção gradativa de cepas psicrotróficas de *B. cereus* a partir de cepas originalmente mesófilas

Os ensaios referentes à possível seleção de cepas psicrotróficas, a partir de cepas originalmente mesófilas inoculadas experimentalmente em leite mantido sob refrigeração, constam da Tabela 5.11.

Tabela 5.11 Comportamento de cepas de *B. cereus* originalmente mesófilas, adaptadas ao crescimento em leite mantido a 7°C.

Cepas de <i>B. cereus</i>	Contagens (log UFC/mL) após diferentes períodos de incubação (dias)				
	0	7	14	21	28
A	3,53	3,53	3,47	3,54	4,00
B	3,51	3,50	3,54	3,30	-
C	3,49	3,50	3,38	3,77	4,00
D	3,51	3,49	3,53	3,77	4,54
E	3,47	3,53	3,47	3,77	4,17
F	3,47	3,50	3,41	3,77	4,65
G	3,51	3,47	3,50	3,87	4,84
H	3,51	3,50	3,49	3,84	4,81
I	3,59	3,50	3,50	3,81	-
J	3,47	3,51	3,50	3,95	4,92



Figuras 5.5 a e b Comportamento de *B. cereus* no leite mantido à 7°C, após sucessivas transferências

Os ensaios foram conduzidos com dez cepas *B. cereus* originalmente mesófilas isoladas das amostras de leite analisadas. O comportamento das cepas permite a possibilidade de gradativa seleção de cepas adaptadas ao crescimento em baixas temperaturas.

Após três transferências consecutivas e 21 dias de incubação, as populações permaneciam inalteradas ou com evolução pequena na terceira transferência, ao passo que com 28 dias já se constatava uma nítida evolução da população de algumas cepas testadas. Assim, no caso das cepas D, F, G, H e J, caracterizou-se um aumento populacional superior a 1 ciclo log.

Estes resultados são semelhantes aos relatados por Foegeding e Berry (1997), que estudaram a seleção de cepas de *B. cereus* adaptadas à temperatura de 7°C, após sucessivas transferências em caldo BHI; estes autores observaram que 19 entre 27 cepas testadas (70,4%), isoladas de alimentos e casos clínicos, eram capazes de crescer a 7°C após adaptação em caldo BHI durante 5 semanas.

Estes resultados têm implicações no aspecto prático, quando se reconhece que *B. cereus* adere-se facilmente à superfície de equipamentos, na indústria de laticínios. Nestas condições, caso haja deficiências nos programas de limpeza e sanitização, haverá possibilidade de formação de biofilmes em áreas de tubulações e tanques mantidos em baixas temperaturas e, em consequência, poderá haver a gradativa seleção de cepas psicrófilas, com sérias consequências na deterioração do leite comercial e até mesmo no aspecto de saúde pública.

Ainda, com base nos resultados obtidos, foi tentativamente calculado o tempo de geração (G) das cepas evidenciando crescimento mais acentuado, selecionando-se apenas as contagens do período 21 e 28 dias, e aplicando-se a equação descrita por Stumbo (1973),

$$G = \frac{0,31 t}{\log N - \log N_0}$$

onde:

G = tempo de geração

t = período de incubação (em dias)

N= população final

N₀= população inicial

Os valores calculados constam da Tabela 5.12

Tabela 5.12 Estimativas de tempos de geração (G) de *B. cereus* em leite incubado a 7°C

Cepas de <i>B. cereus</i>	Valores G (dias)
A	4,58
B	*NC
C	9,16
D	2,73
F	5,26
G	2,34
H	2,17
I	NC
J	2,17

*Não Cresceu

As cepas G, H e J foram as que revelaram menores tempos de geração após adaptação às temperaturas de refrigeração. Mesmo assim, comparando-se com os dados de outros pesquisadores (Griffiths, 1981; Meer, 1991), os valores G constatados na presente pesquisa são muito maiores do que os relatados por estes autores. É provável que as condições prevalentes de temperatura em nosso meio selecionem a presença maior de cepas mesófilas, o que não ocorreria em países de clima frio ou temperado, nos quais a presença de cepas psicrotróficas seria mais freqüente.

Com base nestes resultados, pode-se propor uma estimativa para o período necessário de armazenamento do leite de forma a se atingir populações de *B. cereus* potencialmente capazes de causar intoxicações (Tabela 5.13). Estes valores são válidos para cepas testadas, os quais foram isoladas como parte da microbiota natural das amostras obtidas.

Tabela 5.13 Estimativa do * tempo (dias) necessário para se alcançar populações de 10^6 UFC/de *B. cereus*, em leite a 7°C

Contaminação inicial (UFC/mL)	Quantidade ingerida de leite (mL)		
	100	200	500
10^1	21,6	19,4	16,9
10^2	14,4	12,2	9,40
10^3	7,20	4,90	2,10
10^4	0,00	0,00	0,00

* Valores calculados assumindo $g = 2,17$ dias

Portanto, partindo-se de níveis de contaminação inicial reduzidos (na faixa de 10^1 UFC/mL), o tempo de incubação do leite até atingir níveis infectantes seria muito prolongado oscilando entre 21,6 a 16,9 dias, para consumo variando de 100 a 500mL, respectivamente. Quando se considera que, nas condições vigentes no Brasil, o período máximo de incubação do leite pasteurizado refrigerado não se estende além de 3 a 4 dias, constata-se que esta possibilidade seria totalmente descartada.

No entanto, em países onde as condições de higiene na produção e cadeia de refrigeração são bastante rígidas (Estados Unidos e alguns países europeus), o leite pasteurizado permanece em boas condições, sob refrigeração, durante 8 a 10 dias. Assim sendo, nessa situação, a partir de uma contaminação inicial de 10^3 UFC/mL, níveis capazes de causar intoxicação seriam atingidos após 7,2, 4,9 e 2,1 dias, assumindo ingestão de 100, 200 e 500mL, respectivamente.

5.5. Avaliação da capacidade de produção de enterotoxina por cepas de *B. cereus* isoladas de leite.

Numa primeira etapa deste estudo avaliou-se a capacidade de produção de enterotoxina diarreica por cepas originalmente isoladas das amostras de leite pasteurizado analisadas. Foram examinadas 12 cepas (de biotipos 2) e uma cepa de referência (*B. cereus* NCTC 11145) reconhecidamente produtora desta toxina.

Na execução dos ensaios preliminares, foram utilizadas condições ótimas para o crescimento da bactéria, usando-se o caldo BHI como substrato e incubando-se a 30°C durante 24h, simultaneamente à inoculação em leite esterilizado, mantido nas mesmas condições. Os resultados obtidos constam da Tabela 5.14.

Tabela 5.14 Produção de enterotoxina por *B. cereus* em caldo BHI e leite, com incubação a 30°C

Meio de cultura	Nº de cepas testadas	Produção de Enterotoxina	
		Nº	%
Caldo BHI	12	12	100
Leite	12	12	100

Os resultados mostraram que todas as cepas testadas, tanto em caldo BHI como em leite foram excelentes produtoras de enterotoxina diarreica a temperatura de 30°C, estes resultados, estão coerentes com os resultados apresentados por Notermans e Tatini(1995), na Holanda que também testaram cepas de *B. cereus* em leite apresentado 89% de positividade nas amostras estudadas.

Numa segunda etapa do ensaio, foram selecionadas quatro cepas comprovadamente produtoras de enterotoxina diarreica e examinadas em relação à capacidade de crescimento e produção de enterotoxina em leite mantido sob diferentes condições de tempo e temperatura. Os resultados obtidos são relatados na Tabela 5.15.

Tabela 5.15 Influência das condições de incubação na produção de enterotoxina em leite

Cepas testadas	Produção de enterotoxina em diferentes condições de incubação (T°C/dias)				
	20/3	15/7	10/7	7/12	5/12
Bc 56	+	+	-	-	-
Bc72	+	+	-	-	-
Bc08	+	+	+	-	-
Bc48	+	+	-	-	-

*fracamente +

Os resultados confirmaram a capacidade de produção de enterotoxina somente em temperaturas acima de 15°C, comprovando que cepas originalmente mesófilas dificilmente cresceriam e produziram enterotoxina diarreica em temperaturas de refrigeração, a não ser que previamente adaptadas a essas condições. Por outro lado, a 15° e 20°C, a presença de enterotoxina foi evidenciada após 72h de incubação, o que comprovou a adequação do leite como substrato, não apenas para crescimento, como também para a produção de enterotoxina diarreica por *B. cereus*. Esta constatação, sem dúvida, reveste-se de importância no aspecto de saúde pública.

Outros pesquisadores (Notermans e Tatini, 1993; Baker e Griffiths, 1995; Rusul e Yaacob, 1995), efetuando pesquisas semelhantes constataram resultados parecidos aos aqui relatados.

Na Figura 5.6, visualiza-se o resultado para o teste de enterotoxina realizado com seis cepas de *B.cereus* inoculadas em leite incubado a 20°C. A coloração verde indica positividade ao reagente do kit. Observa-se que todas as cepas testadas produziram enterotoxina diarreica a esta temperatura, verificando-se, também, que a cepa de número 4 produziu reação bem mais intensa que a cepa número 1 (controle +).

A Figura 5.7 mostra a produção de enterotoxina em leite inoculado com cepas de *B. cereus*, incubado a 15°C durante 7 dias.

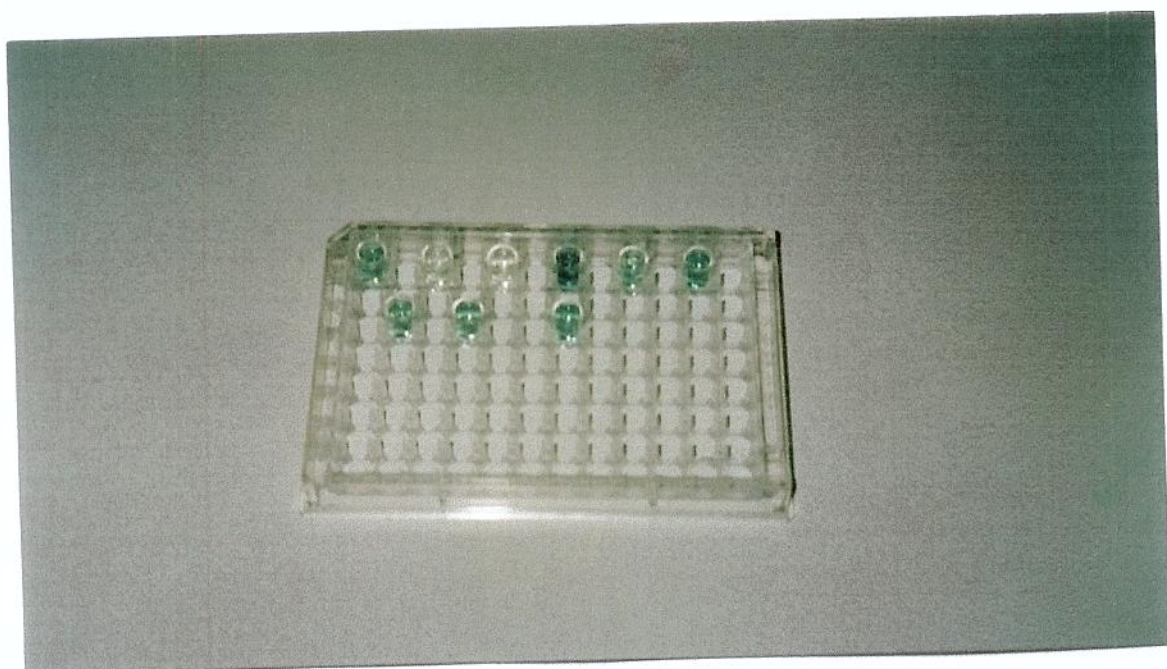


Figura 5.6 Produção de enterotoxina em leite inoculado com cepas de *B. cereus* incubado a 20°C. (esquerda para a direita, e de cima para baixo: 1 (controle+); 2 e 3 (controle -); 4, 5, 6, 7, 8 e 9 (cepas testadas +)

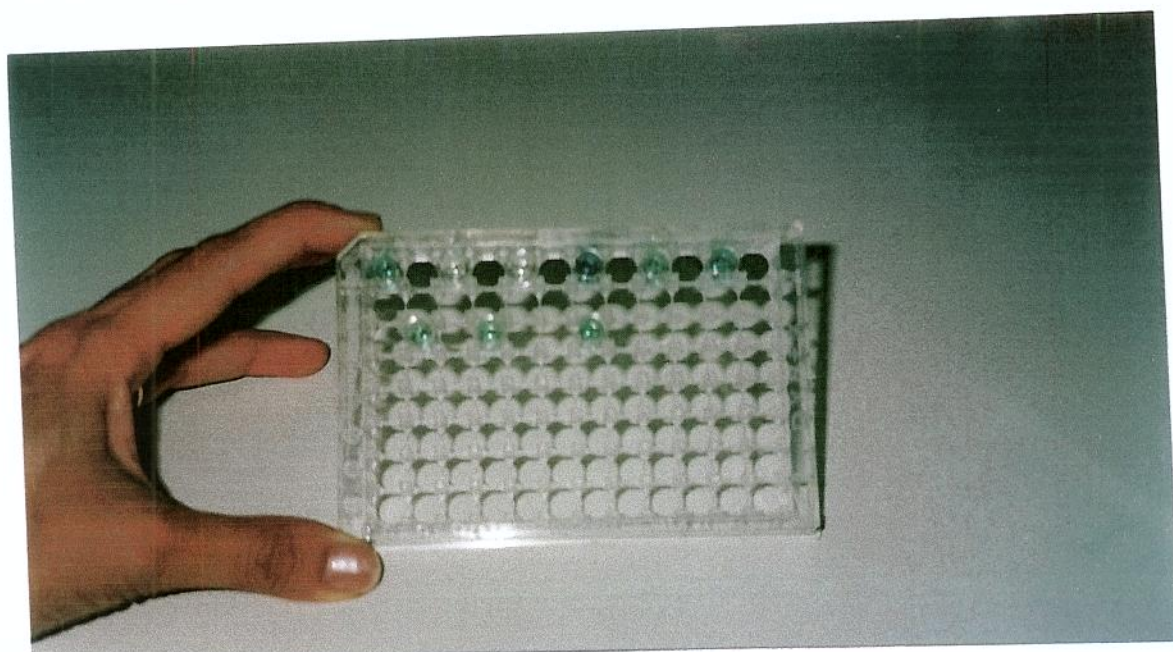


Figura 5.7 Produção de enterotoxina em leite inoculado com *B. cereus* a 15°C depois de 7 dias de incubação. (esquerda para a direita, e de cima para baixo: 1 (controle+); 2 e 3 (controle -); 4, 5, 6, 7, 8 e 9 (cepas testadas +)

Ao contrário dos resultados apresentados nas Figuras 5.6 e 5.7, podemos observar pela Figura 5.8 que não houve produção de enterotoxina em leite a 5°C, mesmo após 12 dias de incubação.

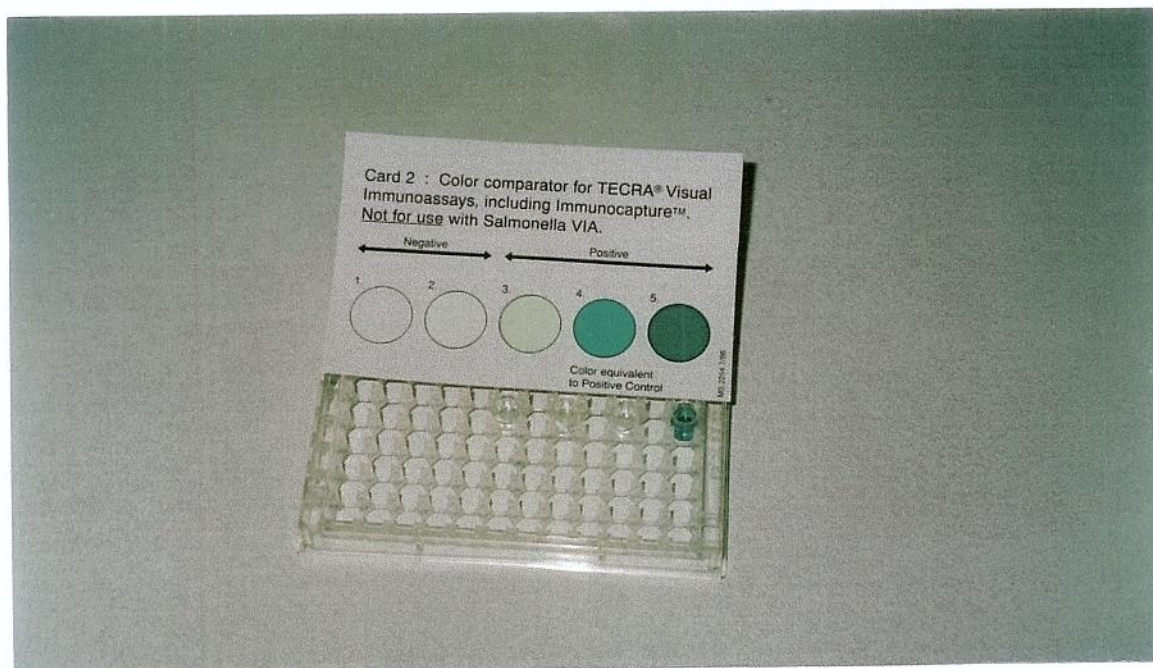


Figura 5.8 Cepas não produtoras de enterotoxina a 5°C após 12 dias de incubação. (da direita para a esquerda: 1 (controle+); 2, 3 e 4 (cepas testadas +)).

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados alcançados na presente pesquisa, são possíveis as seguintes conclusões:

- Comprovou-se a presença de *Bacillus cereus* em amostras de leite comercial pasteurizado, constatando-se maiores níveis de ocorrências nas do tipo C (67,5%), reduzindo-se nas tipos B (50%) e A (27,5%).
- A variação quantitativa da população de *B. cereus* foi bastante evidente em função do tipo de leite analisado, com contagens bem mais elevadas nas amostras do leite tipo C comparativamente às do leite dos tipos B e A. Estes resultados sugerem que as condições higiênicas prevalentes na ordenha e produção de leite provavelmente influenciam na incidência de *B. cereus* no produto final.
- A elevada presença de esporos, mais acentuada nas amostras de leite tipo C, é portanto, indicativa de falhas nas condições higiênicas na ordenha, transporte e processamento. Este aspecto, acrescido de eventuais deficiências na cadeia de refrigeração, geralmente mais frequentes e pronunciadas na produção de leite tipo C de que nos tipos B e A, seriam fatores a considerar na explicação das maiores contagens.
- Foi observada a presença exclusiva de cepas de *B. cereus* tipicamente mesófilas, sem isolamento desta bactéria em temperaturas de refrigeração (7°C), indicando, portanto, a ausência da ocorrência natural de cepas psicrótroficas.
- Em ensaios com inoculação experimental, comprovou-se que *B. cereus* deteriora o leite mais rapidamente somente em temperaturas acima de 15°C, com a deterioração sendo caracterizada por coagulação, com nítida separação de fases, sem mudanças acentuadas de pH e acidez titulável.

- Comprovou-se a possibilidade da gradativa seleção de uma microbiota psicrotrófica de *Bacillus cereus* partindo-se de cepas originalmente mesófilas, sendo esta constatação evidenciada somente após período superior a 21 dias de incubação a 7°C.
- Mesmo cepas adaptadas ao crescimento em temperaturas de refrigeração apresentaram reduzida velocidade de crescimento, com valores "g" mínimos de 2,17 dias, bastante superiores aos relatados em culturas de *B. cereus* isoladas originalmente em países de clima frio ou temperado.
- Comprovou-se a presença de cepas produtoras de enterotoxina diarreica nas amostras analisadas, constatando-se, também, a adequação do leite como substrato para crescimento e produção de enterotoxina diarreica por *B. cereus*.
- Os testes realizados demonstraram a rápida produção de enterotoxina diarreica no leite em temperaturas acima de 15°C, não sendo constatada sua presença em temperaturas de 10°, 7° e 5°C, após 7 dias de incubação.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGATA, N.; MORI, M.; OHTA, M.; SUWAN, S.; OHTANI, I.; ISOBE, M. A novel dodecadepsipeptide, cereulide, isolated from *Bacillus cereus*, causes vacuole formation in HEp-2 cells. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.121, n.1, p.31-34, 1994.
- AGATA, N.; OHTA, M.; ARAKAWA, Y.; MORI, M. The bceT gene of *Bacillus cereus* encodes an enterotoxigenic protein. **Microbiology**, Reading, v.141, n.4, p.983-988, 1995a.
- AGATA, N.; OHTA, M.; MORI, M.; ISOBE, M. An Novel dodecadepsipeptide, cereulide, is an emetic toxin of *Bacillus cereus*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.129, n.1, p.17-20, 1995b.
- AHMED, A.A.H.; MOUSTAFA, M.K.; MARTH, E.H. Incidence of *Bacillus cereus* in milk and some milk products. **Journal of Food Protection**, Ames, v.46, n.2, p.126-128, 1983.
- AHMED, R.; SANKAR-MYSTPY, P.; JACKSON, S.; ACKERMANN, H.; KASATIYA, S. S. *Bacillus cereus* phage typing as an epidemiological tool in outbreaks of food poisoning. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v 33, p.636-640, 1995.
- ALMEIDA, A.A. Microrganismos psicrotróficos em leite e derivados. **Revista do Instituto de Laticínios "Cândido Tostes"**, Juiz de Fora, v.304, n.54, p.184-196, 1998.
- ALMEIDA, A.A.P.; FURTADO FILHO, J. Microrganismos psicrotróficos em leite. **Revista do Instituto de Laticínios "Cândido Tostes"**, Juiz de Fora, v.48, n.287, p.36-40, 1993.

- ANDERSSON, A.; RÖNNER, U.; GRANUM, P.E. What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*? **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.28, n.2, p.145-155, 1995.
- ANGULA, L.; LORENZO, A.; RIVEIRO, M. Isolation and identification of thermotolerant flora of raw cow's milk from the province of Pontevedra. **Modern Microbiological Methods for Dairy Products** In: Proceedings of International Seminar in Santander, Spain, 1989.
- AUCLAIR, J. Processes avoiding recontamination of pasteurized milk. **Bulletin of the International Federation**, Brussels, n.200, p.15-16, 1986.
- AZEREDO, R.C.M. **Estimativa de riscos relacionados à contaminação de preparações de arroz de *Bacillus cereus***. Campinas, 1998. 138p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- AZEREDO, R.C.M.; SERRANO, A.M Cereulídeo: A toxina emética de *Bacillus cereus*. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.33, n.1, p.22-26, 1999.
- BAKER, J.M.; GRIFFITHS, M.W. Evidence for increased thermostability of *Bacillus cereus* enterotoxin in milk. **Journal of Food Protection**. Ames, v.58, n.4, p.443-446, 1995.
- BATIST, B.K.; CHANDER, H.; ZUNDEGWI, C.K.; BHATIA, L.K.; SINGH, S.P. Antibacterial activity of lactoferrin against some common foodborne pathogenic organisms. **Journal of Dairy Technology**, London, v.43, n.3, p.16-18. 1988.

- BECKER, H.; SCHALLER, G.; WIESE, W.; TERPLAN, G. *Bacillus cereus* in infants foods and dried milk products. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.23, n.1, p.1-15, 1994.
- BEECHER, D.J.; SCHOENI, J.L.; WONG, A.L. Enterotoxic activity of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. **Infection and Immunity**, Washington, v.63, n.11, p.4423-4428, 1995.
- BEECHER, D.J.; WONG, A.L. Identification and analysis of the antigens detected by two commercial *Bacillus cereus* diarrheal enterotoxin immunoassay kits. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.60, n.12, p.4614-4616, 1994.
- BIDOCHKA, J.M.; SELINGER, B.L.; KHACHATOURIANS, G.G. A *Bacillus thuringiensis* isolate found on grapes imported from California. **Journal of Food Protection**, Ames, v.50, n.10, p.857-858, 1987.
- BODYFELT, F. Heat resistant psychrotrophs affect quality of fluid milk. **Journal of Dairy Research**, Amsterdam, v.81, n.3, p.96-98, 1980.
- BRETT, M.M. Kits for detection of some bacterial food poisoning toxin: problems pitfalls and benefits. **Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement**, Oxford, v.84, p.1105-1185, 1998.
- BUCHANAN, R.L.; SCHULTZ, F.J. Evaluation of the oxoid BCET-RPLA kit for the detection of *Bacillus cereus* diarrheal enterotoxin as compared to cell culture cytotoxicity. **Journal of Food Protection**, Ames, v.55, n.6, p.440-443, 1992.
- BURREL, P.; FARR, L.; BATES, T.; TAN, A. A rapid enzyme immunoassay for detection of *Bacillus cereus* diarrheal enterotoxin in food and culture supernatants. **Journal of Applied Bacteriology**, London, v.71, n.6, xxii, 1991.

- BURTON, H. Monograph on pasteurized milk microbiological aspects. **Bulletin of the International Federation**, Brussels, n.200, p.9-14, 1986.
- CHOUDHERY, A.K.; MIKOLAJCIK, E.M. Activity of *Bacillus cereus* Proteinases in milk **Journal Dairy Science**, Savoy, v.53, n.3, p.363-366, 1970.
- CHRISTIANSSON, A. Enterotoxin production in milk by *Bacillus cereus* : A comparison of methods for toxin detection. **Bulletin of the International Federation**, Brussels, n.287, p.54-59, 1993.
- COGHILL, D.; JUFFS, H.S. Incidence of psychrotrophic sporeforming bacteria in pasteurized milk and cream products effect of temperature on their growth. **Journal of Dairy Technology**, Amsterdam, v.34, n.5, p.150-153, 1979.
- COLLINS, E.B. Heat resist psychrotrophic microorganisms. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.64, p.157-160, 1981.
- COLLINS, S.J.; BESTER, B.H.; MCGILL, A.E.J. Influence of psychrotrophic bacterial growth in raw milk on the sensory acceptance of UHT skim milk. **Journal of Food Protection**, Ames, v.56, n.5, p.418-425, 1993.
- COSTA, L.C.G.; CARVALHO, E.P.; CARVALHO, A.S. Qualidade microbiológica do leite cru obtido por ordenha manual e mecânica, na fonte de produção. **Revista do Instituto de Laticínios "Cândido Tostes"**, Juiz de Fora, v.33, n.195, p.3-12, 1984.
- COUSIN, M.A. Presence activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products. A Review. **Journal of Food Protection**, Ames, v.45, n2, p.172-207, 1982.

- CRIELLY, E.M.; LOGAN, N.A. ANDERTON, A. Studies on the *Bacillus* flora of milk products. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.77, n.3, p.256-263 1994.
- DAMGAARD, P.H.; LARSEN, H.D.; BRESCIANI, J.; JORSEN, K. Enterotoxin producing strains of *Bacillus thuringiensis* isolated from foods. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.23, p.146-150, 1996.
- D'AUBERT, S.; ABBATI, P.; CANNONI, C. Sull'intossicazione alimentare da *Bacillus cereus*. **Industrie Alimentare**, Pinerolo, v.19, n.12, p.913-926, 1980.
- DAY, T.L.; TATANI, S.R.; NOTERMANS, S.; BENNETT, R.W. A comparison of RPLA for detection *Bacillus cereus* diarrhoeal enterotoxin. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.77, n.3, p.9-13, 1994.
- DELAZARI, I.; LEITÃO, M.F.F.; GERALDINI, A.M.; UBOLDI EIROA, M.N. *Bacillus cereus* em alimentos desidratados. **Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, Campinas, n.60, p.31-39, 1978.
- DRIESSEN, M.F. Importance of *Bacillus cereus* in fermented milks and processed non fermented dairy foods. **Bulletin of the International Federation**, Brussels, n.287, p.11-15, 1993.
- DROBNIEWSK, F.A. *Bacillus cereus* and related species. **Clinical Microbiology Review**, Washington, v.6, n 4, p 324-338, 1993.
- DUFRENE, J.; SOENTORO, P.; TATINI, S.; DAY, T.; NOTERMANS, S. Characteristic of *Bacillus cereus* related to safe food production. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.23, n.1, p.99-109, 1994.

- DUFRENE, J.; BIJWAARD, M.; GIFFEL, M.; BEUMER, R.; NOTERMANS, S.
Characteristic of some psychrotrophic *Bacillus cereus*, isolates. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, 27, n. 2/3, p. 175-183, oct. 1995.
- EDDY, B.P. The use of the term psychrotrophic. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.23, n.2, p.189-190, 1960.
- FAIRBAIRN, D.J.; LAW, B.A. Proteinases of psychrotrophic bacteria their production, properties, effects and control. **Journal of Dairy Research**, Great Britain, v.54, n.1, p.139-177, 1986.
- FERMANIAN, C.; FREMY, J.M.; CLAISSE, M. Effect of temperature on the vegetative growth of type and field strains of *Bacillus cereus*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.19, n.6, p.414-418, 1994.
- FERMANIAN, C.; LAPEYRE, C.; FREMY, J.M.; CLAISSE, M. Production of diarrheal toxin by selected strains of *Bacillus cereus*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.30, n.3, p.345-358, 1996.
- FOEGEDING, M.P.; BERRY, D.E. Cold temperature growth of clinical and foods isolates of *Bacillus cereus*. **Journal of Food Protection**, Ames, v.60, n.10, p.1256-1258, 1997.
- FRANK, J.F. Milk and Dairy Products. In: DOYLE, M.P.; BECHAUT, L.R.; MONTVILLE, T.J. eds. **Food Microbiology Fundamentals and Frontiers**, Washington. ASM Press. p.101-116, 1997.
- GARCIA-ARRIBAS, M.L.; KRAMER, J.M. The effect of glucose, starch, and pH on *B. cereus* associated with food poisoning and non-gastrointestinal infection. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 11, n. 1, p.21-34, 1990

- GILBERT, R.J. *Bacillus cereus* gastroenteritis. In: RIEMANN, H; BRYAN, L.F. eds. **Foodborne infection and intoxications** 2 ed. New York: Academic Press, 1979, p.495-518.
- GIANNELLA, R.A.; BRASILE, L. A hospital food-borne outbreak of diarrheal caused by *Bacillus cereus*: clinical, epidemiologic and microbiologic studios. **The Journal of Infection Diseases**, London, v.139, n.3, p.366-370, 1979.
- GOEPFERT, J.M.; SPIRA, W.M.; KIM, V.H. *Bacillus cereus*: Food poisoning organism: a review. **Journal of Milk and Food Technology**, Des Moines, v.35, n.4, p. 213-223, 1972.
- GOMES, F.M.; LEMOS, M.A. Implantação, transporte e coleta de leite a granel. **Revista do Instituto de Laticínios "Cândido Tostes"**, Juiz de Fora, v. 54, n.309, p.184-196, 1999.
- GOMES, M.I.F.V. Alterações na qualidade do leite pasteurizado pela ação de lipase microbiana. Piracicaba: ESALQ, 1988. 85p. (Tese – Mestrado em Tecnologia de Alimentos).
- GORDON, R.E. The genus *Bacillus*. In: LASKIN, A.I.; LECHEVALIER, H.A. eds. **Handbook of Microbiology**. Cleveland: CRC Press, v.1, p.71-88, 1973.
- GRANUM, P.E. *Bacillus cereus* and its toxins. **Journal of Applied Bacteriology, Symposium Supplement**, Oxford, v.76, n.23, p.61s-66s, 1994.
- GRANUM, P.E.; BRYNESTAD, S.; KRAMER, J.M. Analysis of enterotoxin production by *Bacillus cereus* from dairy products, food poisoning incidents and non-gastrointestinal infections. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.17, n.4, p.269-279, 1993a.

- GRANUM, P.E.; BRYNESTAD, S.; O'SULLIVAN, K.; NISSEN, H. Enterotoxin from *Bacillus cereus*: Production and biochemical characterization. **Bulletin of the International Federation**, Brussels, n.287, p. 38-41, 1993b.
- GRANUM, P.E.; NISSEN, H. Sphingomyelinase is part of the "enterotoxin complex" produced by *Bacillus cereus*. **FEMS Microbiology Letters**, **Amsterdam**, v.110, n.1, p.97-100, 1993
- GRANUM, P.E. *Bacillus cereus*. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T.J. ed. **Microbiology Fundamentals and Frontiers**. Washington: ASM Press, p.327-336, 1997.
- GRIFFITHS, M.W.; PHILLIPS, J.D. Incidence, source and some properties of psychotrophic *Bacillus spp.* found in raw and pasteurized milk. **Journal of the Society of Dairy Technology**, **Amsterdam**, v.32, n.4, p.62-66, 1990.
- GRIFFITHS, M.W. Toxin production by psychotrophic *Bacillus spp.* present in milk. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.53, n, 8, p.790-792, 1990.
- GRIFFITHS, M.W. *Bacillus cereus* in liquid milk and other milk products. **Bulletin of the International Dairy Federation**, Brussels, n.275, p.36-39, 1992.
- GRIFFITHS, M.W.; PHILLIPS, J.D; MUIR, D.D. Development of flavour defects in pasteurized double cream during storage at 6 and 10⁰C. **Journal of the Society of Dairy Technology**, Amsterdam v.34, p.142-146, 1981.
- GROSSOKOPF, J.C.; HARPER, W.J. Isolation and identification of psychrotrophic sporeformes in milk. **Milchwissenschaft**, v.29, p.467-470, 1974.
- GROSSOKOPF, J.C.; HARPER, W.J. Role of psychrotrophic sporeformes in long life milk. **Journal of Dairy Science**, v.52 (supplement), p.897, 1969.

- HARMON, S.M. New method for differentiating members of the *Bacillus cereus* group: collaborative study. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists** Washington, v.65, n.5, p.1134-1139, 1992.
- HARMON, S. M.; GOEPFERT, J. M.; BENNETT, R. W. *Bacillus cereus*. In: VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D. F., eds. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3d. ed. Washington: American Public Health Association (APHA), 1992. P. 593-604.
- HASSAN, G.; NABBUT, N. Prevalence and characterization of *Bacillus cereus* isolates from clinical and natural sources. **Journal of Food Protection**, DesMoines, v.59, n.2, p.193-194, 1996.
- HOLMES, J.R.; PLUNKETT, T.; PATEL, P.; ROPER, W.L.; ALEXANDER, W.E. Emetic food poisoning caused by *Bacillus cereus*. **Archives of Internal Medicine**, Chicago, v.141, n.6, p.766-767, 1981.
- HUHN, S.; HAJDENWURCEL, J.R.; MORAES, J.M.; VARGAS, O.L. Qualidade microbiológica do leite cru obtido por meio de ordenha manual e mecânica e ao chegar à plataforma. **Revista do Instituto de Laticínios "Cândido Tostes"**, Juiz de Fora, v.35, n.209, p.3-8, 1980.
- HUSMARK, U. ; RONNER, U.S. Forces involved in adhesion of *Bacillus cereus* spores to solid surfaces under different environmental conditions. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.69, n.4, p.557-562, 1990.
- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Milk production, **Bulletin of International Dairy Federation**, Brussels, n.333, p.1-6, 1998.
- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Consumption, **Bulletin of International Dairy Federation**, Brussels, n.333, p.13-15, 1998.

UNICAMP

BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Industrial milk treatment and processing, **Bulletin of International Dairy Federation**, Brussels, n.333, p.9-10, 1998.
- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Milk production, **Bulletin of International Dairy Federation**, Brussels, n.333, p.17-38, 1998.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos**, 3 ed. São Paulo, 1985, 553p.
- ISEPON, J.S.; JUNIOR, M.S.N.; PEREIRA, R.L. Avaliação da qualidade do leite pasteurizado por mini-usinas de beneficiamento. **Revista do Instituto de Laticínios "Cândido Tostes"**, Juiz de Fora, v.54, n.309, p.120-124, 1999.
- IVERS, J.T.; POTTER, N.N. Production and stability of hemolysin, phospholipase C and lethal toxin of *Bacillus cereus* in foods. **Journal of Food Protection**, Ames v.40, n.1, p.17-22, 1977
- JAQUETTE, B.C.; BEUCHAT, R.L. Survival and growth of psychrotrophic *Bacillus cereus* in dry and reconstituted infant rice cereal. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.61, n.12, p.1629-1635, 1998.
- JOHNSON, C.E.; BONVENTRE, P.F. Lethal toxin of *Bacillus cereus*. **Journal of Bacteriology**, Washington. v.9, n.2, p.306-316, 1967.
- JOHNSON, K.M. *Bacillus cereus* foodborne illness; an update. **Journal of Food Protection**, Ames, v.47, n.2, p.145-153, 1984.
- JOHNSON, K.M.; NELSON, C.L.; BUSTA, F.F. Germination and heat resistance of *Bacillus cereus* spores from strains associated with diarrheal and emetic foodborne illness. **Jornal of Food Science**, Chicago, v.47, n.4, p.1268-1271, 1982.

- JOHNSTON, P.W.; BRUCE, J. Incidence of thermotolerant psychrotrophic in milk produced in west of Scotland. **Journal of Bacteriology**, Reading, v.52, n.3, p.333-337, 1982.
- KAMAT, A.S.; NENE, S.P.; NERKAR, D.P.; NADKARNI, G.B. The nature of toxins produced *Bacillus cereus* BIS-59. **Journal of Food Safety**, Trumbull, v.8, p.71-81, 1986.
- KRAMER, J.M.; GILBERT, R.J. *Bacillus cereus* and others *Bacillus* species in: Doyle, M. P., ed. **Foodborne bacterial pathogens**. New York: Marcel. Dekker, 1989, p.21-69.
- LANGEVELD, L.P.M.; VAN SPROSEN, W.A.; VAN BERESTEIJN, E.C.H.; NOTERMANS, S.H.W. Consumption by healthy adults of pasteurized milk with a high concentration of *Bacillus cereus*: A double-blind study. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.59, n.7, p.723-726, 1996.
- LARSEN, H.D.; JORGENSEN, K. The occurrence of *Bacillus cereus* in Danish pasteurized milk. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam, v.34, n.2, p. 179 –186, 1997.
- LEITÃO, M.F.F.; TEIXEIRA, L.T.; MORI, E.E.M. Bactérias termotóxicas não esporogênicas e seu significado na qualidade do leite comercial pasteurizado. **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.17, n.1, p.54-64, 1987a.
- LEITÃO, M.F.F. Microbiologia e controle higiênico- sanitário na produção de massas alimentícias. In: VITT, P.; LEITÃO, R.F. Tecnologia de massas alimentícias e biscoitos; **Manual Técnico**. Campinas, ITAL, p.89-104, 1987b.

- LEITÃO, M.F.F.; DELAZARI, I.; MAZZONI, H. Microbiologia de alimentos desidratados. **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.5, n.4 p.223-241, 1973/74.
- MAHARI, T.; GASHE, B. A survey of the microflora of raw and pasteurized and the sources of contamination an milk processing plant in Addis Abeba-Ethiopia. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v.57, n.9, p.233-238,1992.
- MARTINS, L.F.S.; NUSSBAUM, J.R. Avaliação das condições higiênico- sanitários do leite na bacia leiteira de Pelotas, Rio Grande do Sul. **Encontro de Pesquisas Veterinárias**, 1, Londrina-PR, p.31-2, 1984.
- MARTIN, J.H.; STALLY, P.D.; HARPER, J.W. The incidence an nature of the sporeforming microoganisms in the Ohio milk supply. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v.44, p.161, 1981.
- MARTIN, J.H.; STALLY, P.D.; HARPER, J.W. Significance of bacterial spores in milk. **Journal of Milk and Food Technology**, Des Moines, v.37, p.94, 1974.
- MATTILA, T.; MANIEN, M.; KYLÄSIUROLA, A. L. Effets of cleanning in place disinfectants on wild bacterial strains isolated from a milking line. **Journal Dairy Research**, Cambridge, v.57, n.2, p.33-39, 1990.
- MEER, R.R.; BAKER, J.; BODYFELT, F.W.; GRIFFITHS, M.W. Identification and characterization of heat-resistant psychrotrophic bacteria Oregon grade raw milk. **Dairy Food and Environmental – Sanitation**, London, v.13, n.11, p.631-637, nov. 1993.
- MEER, R.R.; BAKER, J.; BODYFELT, F.W.; GRIFFITHS, M.W. Psychrotrophic *Bacillus spp.* in fluid milk products: A review. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.54, n.12, p. 969-979, 1991.

- MELLING, J.; CAPEL, B.J.; TURNBULL, P.C.B.; GILBERT, R.J. Identification of a novel enterotoxigenic activity associated with *Bacillus cereus*. **Journal of Clinical Pathology**, London, v.29, p.938-940, 1976.
- MELLING, J.; CAPEL, B.J.; TURNBULL, P.C.B.; GILBERT, R.J. Characteristics of *Bacillus cereus* emetic toxin. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.45, n.3, p.xxv, 1978.
- MIDURA, T.; GERBER, M.; WOOD, R.; LEONARDO, A.R. Outbreak of food poisoning caused by *Baccillus cereus*. **Public Health Reports**, Washington, v. 85, n.1, p. 45-48, 1970.
- MIKAMI, T.; HORIGAWA, T.; MURAKAMI, T.; MATSUMOTO, T.; YAMAKAMA, A.; MURAYAMA, S.; KATAGIRI, S.; SHINAGAWA, K.; SUZUKI, M.A. An improved method for detecting cytostatic toxin (emetic toxin) of *Bacillus cereus* and its application to food samples. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.119, n.1-1, p.53-58, 1994.
- MIKOLAJCIK, M.E.; SIMOM, T.W. Heat resistant psychrotrophic bacteria in raw milk and their growth at 7°C. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.41, n.2, p.93-95, 1978.
- MORENO, I.; VIALTA, A.; LERAYER, A.L.S.; SALVA, T.J.G.; VAN DENDER, A. G.F.; WOLF, B.; GONÇALVES, V.R.; PICOLLI, B. Incidência de bactérias esporogênicas aeróbias em produtos lácteos e sua sensibilidade à nisina. **Revista do Instituto de Laticínios "Cândido Tostes"**, Juiz de Fora, v.309, n.54, p.46-49, 1999.
- MORSE, P.M. Investigation of factors contributing to the bacterial count of bulk tarak milk. III Increase in count, from cow to bulk tank and effects of refrigerated

- storage and preliminary incubation. **Journal Dairy Science**, Savoy, 51: 1992 – 1206. 1968.
- MOTTAR, J.; WAES, G. Quality control of pasteurized milk. **Bulletin of the International Federation**, Brussels, n.200, p.66-70, 1986.
- MUTUKUMIRA, A.N.; FERESU, S.B.; NARVHUS, J.A.; ABRAHAMSEN, R.K. Chemical and microbiological quality of raw milk produced by Smallholder farmers in Zimbabwe. **Journal of Food Protection**, Ames, v.59, n.9, p.984-987, 1996.
- NOTERMANS, S.; DUFRENE, J.; TEUNIS, P.; BEUMER, R.; Te GIFFEL, M.; WEEN PEETERS, P. A risk assessment study of *Bacillus cereus* present in pasteurized milk. **Food Microbiology**, London, v.14, n.2, p.143-151, 1997.
- NOTERMANS, S.; BATT, C.A. A risk assessment approach for food-borne *Bacillus cereus* and its toxins. **Journal of Applied Microbiology**, Reading, v.84, p.515-615, 1998. (Suppl. Symposium).
- NOTERMANS, S.; TATINI, S. Characterization of *B. cereus* in relation to toxin production. **Netherlands Milk and Dairy Journal**, Meppel, v.47, n.2, p.71-77. 1993.
- ODUMERU, J.A.; TONER, A.K.; MUCKLE, C.A.; GRIFFITHS, M.W.; LYNCH, J.A. Detection of *Bacillus cereus* diarrheal enterotoxin in raw and pasteurized milk. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.60, n.11, p.1391-1393, 1997.
- OMBUI, J.N.; SCHMIEGER, H.; KAGIRO, M.M.; ARIMI, S.M. *Bacillus cereus* may produce two or more diarrheal enterotoxins. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.149, n.2, p.245-248, 1997.

- OVERCAST, W.W.; ATMARAN, K. The role of *Bacillus cereus* in sweet curdling of fluid milk. **Journal of Milk Food Technology**, London, v.37, p. 233-236, 1976.
- PASSOS, M.H.C.R.; KUAYE, A.Y. Avaliação de surtos de enfermidades transmitidas por alimentos comprovadas laboratorialmente no município de Campinas-SP, no período de 1987 a 1993. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v.56, n.1, p.77-82, 1996.
- PATEL, T.R.; BARTLETT, F.M.; HAMIO, J. Extracellular heat-resistant proteases of psychrotrophic *Pseudomonas*. **Journal of Protection**, Ames, v.46, n.2, p.90-94, 1983.
- PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E.C.S. **Microbiologia**; Trad. de PEREIRA, M. A. M. São Paulo: McGraw-Hill, 1986. vol. II 495p.
- PHILLIPS, J.D.; GRIFFITHS, M.W. Factors contributing to the seasonal variation of *Bacillus spp.* in pasteurized dairy products. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.61,p.275-285, 1986.
- RAEVUORI, M.; GENIGEORGIS, C. Effect of pH and sodium chloride on growth of *Bacillus cereus* in laboratory media and certain foods. **Applied Bacteriology**, Baltimore, v. 29, n. 1, p. 68-73, 1975.
- RHODEHAMEL, E.J.; HARMON, S.M. *Bacillus cereus* In: FDA. **Bacteriological Analytical Manual** 8 ed. ver. Gaithersburg: AOAC International Chapt 14, p. 1401-1408. 1998.
- RONNER, U.; HUSMARK, U; HENDRIKSSON, A. Adhesion of *Bacillus* spores in relation to hydrophobicity. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.69, n.4, p. 550-556, 1990.

- ROWAN, N.J.; ANDERSSON, J.G. Maltodextrin stimulates growth of *Bacillus cereus* and synthesis of diarrheal enterotoxin in infant milk formulate. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.63, n.3, p.1182-1184, 1997.
- RUSUL, G.; YAACOB, N.H. Prevalence of *Bacillus cereus* in selected foods and detection of enterotoxin using TECRA-VIA and BCET-RPLA. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.25, n.2, p.131-139, 1995.
- SALZBERG, S.P.; MASSAGUER, P.R.; SERRANO, A .M. Estudo epidemiológico e microbiológico de um surto de intoxicação alimentar. **Revista de Microbiologia**. São Paulo, v.13, n.1, p.26-30, 1982.
- SCHOKEN-ITURRINO, R.; NADER FILHO, A. Ocorrência de bactérias esporuladas dos generos *Bacillus e Clostridium* em amostras de leite longa vida. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.10, n.42, p.25-27, 1996.
- SCHRODER, M.J.A.; BLAND, M.A. Effect of pasteurization temperature on the keeping quality of whole milk. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v.51, p.569-578, 1984.
- SEARS, C.L.; KAPER, J.B. Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. **Microbiological Reviews**, Washington, v.60, n.1, p.167-215, 1996.
- SHARIF F. A.; ALAEDDINOGLU, G.A. Rapid and simple method for staining of the crystal protein of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Industrial Microbiology**, Amsterdam, v.3, p.227-229, 1988.
- SHINAGAWA, K; MATSUSAKA, N.; KOKUMA, H.; KURATA, H. The relation between the diarrheal and other biological activities of *Bacillus cereus* involved in

food poisoning outbreaks. **Japanese Journal of Veterinary Science**, Tokio, v. 47, n.4, p. 557-565, 1985.

SHINAGAWA, K.; OTAKE, S.; MATSUSAKA, N.; SUGH, S. Production of the vacuolation factor of *Bacillus cereus* isolated from vomiting-type food poisoning. **Journal of Veterinary Medicine Science**, Tokio, v. 54, n.3, p. 443-446, 1992.

SHINAGAWA, K. Serology and characterization of toxigenic *Bacillus cereus*. **Netherlands Milk and Dairy Journal**, Meppel, v. 47, n.2, p.89-103, 1993.

SHINAGAWA, K. Analytical methods for *Bacillus cereus* and others species. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 10, p.125-142, 1990.

SHINAGAWA, k.; KOKUMA, H.;SEKITA,S.; SUGH,S. Emesis of rhesus monkeys induced by intragastric administration with the Hep-2 vacuolation factor (cerulide) produced by *Bacillus cereus* **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 130, n.1, p.87-90, 1995.

SHINAGAWA, K.; SATO, K.; KOKUMA, H.; MATSUSAKA, N.; SUGH, S. Fluid accumulation in mouse ligated intestine inoculated with the vascular permeability factor produced by *Bacillus cereus* . **Journal of Veterinary Medicine Science**, Tokio, v.53, n.2, p. 167-171, 1991.

SILVEIRA, V.V.; SAKUMA, H.; DUARTE, M.; RODAS, M. A. B.; SARUWTARI, J.H.; CHICOUREL, E.L. Avaliação das condições físico-químicas e microbiológicas do leite pasteurizado consumido na cidade de São Paulo. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 49, n. 1, p. 19-25, 1989.

SIMONE, E.; GOOSEN, M.; NOTERMANS, S.H.W.; BORGDORFF, M.W.

Investigation of foodborne diseases by food inspection services in the Netherlands, 1991-1994. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.60, n.4, p.442-446, 1997.

SPIRA, W.M.; SILVERMAN, G.J. Effects of glucose pH and dissolved-oxygenation on *Bacillus cereus* growth and permeability factor production in batch culture.

Applied and Environmental Microbiology, Washington, v.37, n.1, p.109-116, 1979.

SPIRA, W.M.; GOEPFER, T.J.M. *Bacillus cereus* induce fluid accumulation in rabbit ileal loops. **Applied Microbiology**, Baltimore, v.24, n.3, p.341-348, 1972.

SNEATH, P.H.A.; MAIR, N.S.; SHARPE, M.E.; HOLT, J.G. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Volume 2. Williams ; Wilkins, Baltimore, USA, 1986, 1104-1141 p.

STADHOUDERS, J. Taxonomy of *Bacillus cereus*. **Bulletin of the International Dairy Federation**, Brussels, n.275, p.04-08, 1992.

STADHOUDERS, J. *Bacillus cereus* in milk and milk products. **Bulletin of the International Dairy Federation**, Brussels, n.287, p.03-05, 1993.

STADHOUDERS, J.; DRIESSEN, F.M. Other milk products. **Bulletin of the International Dairy Federation**, Brussels, n.275, p.40-45, 1993.

STEWART, D.B. Factors influencing the incidence of *Bacillus cereus* spores in milk. **Journal of the Society of Dairy Technology**, New Delhi, v.28, p.80-85, 1975.

SUTHERLAND, D.A.; MURDOCH, R. Seasonal occurrence of psychrotrophic *Bacillus* species in raw milk and studies on the interactions with mesophilic *Bacillus* sp. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.21, n.4, p.279-292, 1994.

- STUMBO, R. C. Thermobacteriology in Food Processing. 2 ed. p.186, 1973.
- SUWAN, S.; ISOBE, M.; OHTANI, I.; AGATA, N.; MORI, M.; OHTA, M. Structure of celeuride, a cyclic dodecadepsipeptide toxin from *Bacillus cereus* and studies on NMR characteristic of its alkali metal complexes including a conformational structure of the K^+ complexe. **Journal of the Chemical Society, Perkin. Transactions 1**, Cambridge, v.30, n.7, p.765-775, 1995.
- TE GIFFEL, M.C.; BEUMER, R.R.; LEIJENDEKKERS, S.; ROMBOUSTS, F.M. Incidence of *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* in foods in the Netherlands. **Food Microbiology**, London, v.13, n.1, p.53-58, 1996.
- TE GIFFEL, M.C.; BEUMER, R.R.; GRANUM, P.E.; ROMBOUSTS. Isolation and characterization of *Bacillus cereus* from pasteurised milk in household refrigerators in the Netherlands. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.34, p.307-318, 1997.
- THOMPSON, N.E.; KETTERHAGEN, M.J.; BERGDOLL, M.S.; SCHANTZ, E.J. Isolation and some properties of an enterotoxin produced by *Bacillus cereus*. **Infection and Immunity**, Washington, v.43, n.3, p.887-894, 1984.
- TURNBULL, P.C.B.; KRAMER, J.M.; JORGENSEN, K.; GILBERT, R.J.; MELLING, J. Properties and production characteristics of vomiting, diarrheal, and necrotizing toxins of *Bacillus cereus*. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.32, p.219-228, 1979.
- VÄISÄNEN, O.M.; MWAISUMO, N.J.; SALKINOJA-SALONEN, M.S. Differentiation of dairy strains of the *Bacillus cereus* group by phage typing, minimum growth temperature, and fatty acid analysis. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 70, p.315-324, 1991.

- VANDERBERG, M.G. Pasteurization of milk-design and operation. **Bulletin of the International Dairy Federation**, Brussels, n.200, p.35-51, 1986.
- Van NETTEN, P.; VAW D.E; MOOSDIJK, A; VAN HOESEL, P.; MOSSELL, D. A . A .; PERALES, I. Psychrotrophic strains of *Bacillus cereus* producing enterotoxin. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.69, n.1, p.73-79, 1990.
- WESCOTT, G.G.; FAIRCHILD, T. M.; FOEGEDING, P. M. *Bacillus cereus* and *Bacillus stearothermophilus* spore inactivation in batch and continuous flow systems. **Journal of Food Science**, Chicago, v.60, n.3, p. 446-450, 1995.
- WITTER, L.D. Psychrophilic bacteria. A review. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v.44, p.983-1015, 1961.
- Wold Dairy Situation. **Bulletin of the International Dairy Federation**. Brussels, n.333, p.5-30. 1998.
- WONG, H.C.; CHANG, M.-H.; FAN, J.-Y. Incidence and characterization of *Bacillus cereus* isolates contaminating dairy products. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.54, n.3, p.699-702, 1988.
- WONG, H.C.; CHEN, Y.; CHEN, F.L.C. Growth, germination and toxigenic activity of *Bacillus cereus* in milk products. **Journal of Food Protection**, Ames, v.51, n.9, p.707-710, 1987.
- ZALL, R.; CHEN, J. H.; MURPHY, S.C. Production of proteases by psychrotrophic microorganisms. **Cultured Dairy Products Journal**, Reading, v.17, n.4, 5-9, 1982.
- ZOTTOLA, E.A. Special techniques for studying microbial biofilms in food. systems. In: **Food Microbiological Analysis New Technologies** by TORTORELLO, L.M.; SENDEL, M.S. p.315-345. 1997. Ed. Marcel Dekser, Inc. N. York.

ZOTTOLA, E.A. Development of biofilms in food processing environments. **Journal of Food Protection**, Ames, v.53, n.10, p.901, 1990.

ZOTTOLA, E.A. Microbial attachment and biofilm formation: A new problem for the food industry? **Food Technology**, London, v.48, n.7, p.107-114, 1994.