



UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E
MOLECULAR DE *BACILLUS CEREUS* EM GRÃOS**

Valquíria Boff Martelo Reis

Caxias do Sul

2012

Valquíria Boff Martelo Reis

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E
MOLECULAR DE *BACILLUS CEREUS* EM GRÃOS**

“Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia”,

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Longaray Delamare

Co-orientador: Prof. Dr. Jomar Pereira Laurino

Caxias do Sul

2012

Valquíria Boff Martelo Reis

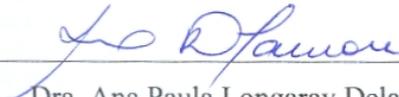
Detecção e caracterização bioquímica e molecular de *Bacillus cereus* em grãos

“Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da
Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção de grau de Mestre em
Biotecnologia”

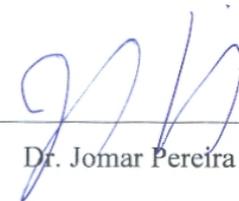
Orientadora: Dra. Ana Paula Longaray Delamare

Co-orientador: Dr. Jomar Pereira Laurino

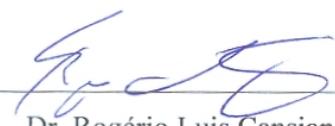
“DISSERTAÇÃO APROVADA EM 14 DE DEZEMBRO DE 2012”.



Dra. Ana Paula Longaray Delamare



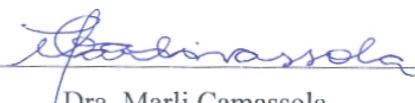
Dr. Jomar Pereira Laurino



Dr. Rogério Luis Cansian



Dra. Eunice Valduga



Dra. Marli Camassola

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
UCS - BICE - Processamento Técnico

R375d Reis, Valquíria Boff Martelo, 1983-
Detecção e caracterização bioquímica e molecular de *bacillus cereus* em grãos / Valquíria Boff Martelo Reis. - 2012.
86 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado) – Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2012.

Apresenta bibliografia.

“Orientação: Prof.^ª. Dr.^ª. Ana Paula Longaray Delamare, Co-orientação: Prof. Dr. Jomar Pereira Laurino”.

1. Alimentos – Microbiologia. 2. Biotecnologia. I. Título.

CDU 2.ed.: 579.67

Índice para o catálogo sistemático:

- | | |
|------------------------------|--------|
| 1. Alimentos – Microbiologia | 579.67 |
| 2. Biotecnologia | 57.08 |

Catalogação na fonte elaborada pelo bibliotecário
Marcelo Votto Teixeira – CRB 10/ 1974

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora, Prof. Ana Paula Delamare pela amizade, por seu auxílio, atenção e paciência.

As queridas colegas e amigas do Laboratório de Biotecnologia que colaboraram com este trabalho.

A UCS e ao Instituto de Biotecnologia.

A todos que, contribuíram direta ou indiretamente para a elaboração, execução e análise deste trabalho.

Ao meu marido Jair, por me apoiar de todas as maneiras em todas as horas que precisei.

A minha família, em especial a minha mãe que sempre ajudou com seu apoio e dedicação.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1. Características do <i>B. cereus</i>	14
2.2 Patogenicidade do <i>B. cereus</i>	17
2.2.1. Hemolisina BL (Hbl)	20
2.2.2. Enterotoxina Não Hemolítica (Nhe).....	21
2.2.3. Citotoxina K (CytK)	21
2.2.4. Enterotoxina BceT	21
2.2.5. Enterotoxina FM.....	21
2.2.6. Cereulida (toxina emética).....	22
2.2.7. Fosfolipase C (PiplC) e Esfingomielinase (Sph).....	22
2.3. Ocorrência de <i>B. cereus</i>	23
2.4. Características de crescimento das estirpes patogênicas de <i>B. cereus</i>	24
2.5. Diversidade e identificação de <i>B. cereus</i>	26
3. MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1. Avaliação da ocorrência de <i>B. cereus</i> em cereais.....	28
3.1.1. Obtenção e isolamento de <i>B. cereus</i>	28
3.1.2. Identificação bioquímica	29
3.2. Avaliação molecular dos isolados de <i>B. cereus</i>	30
3.2.1 Extração do DNA	30
3.3 Detecção de genes relacionados com a patogenicidade	32
3.4. Avaliação dos genes de patogenicidade	33
3.5. Caracterização molecular de <i>B. cereus</i>	33
3.6. Separação e avaliação dos segmentos amplificados.....	34
3.7. Análise estatística	35
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1. Avaliação da ocorrência de <i>B. cereus</i> em cereais.....	36

4.1.1. Isolamento de <i>B. cereus</i>	36
4.2. Identificação bioquímica	43
4.3. Caracterização molecular dos isolados do <i>B. cereus</i>	52
5. CONCLUSÕES.....	64
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características bioquímicas diferenciais do grupo <i>B. cereus lato sensu</i>	16
Tabela 2 – Características dos tipos de doenças causadas por <i>B. cereus</i>	18
Tabela 3 – Tipos de cereais utilizados para a obtenção dos cultivos de <i>B. cereus</i>	28
Tabela 4 – Seqüência de nucleotídeos dos <i>primers</i> utilizados.	32
Tabela 5 - Métodos de amplificação e respectivas soluções utilizadas.	34
Tabela 6 - Ocorrência de <i>B. cereus</i> nos diferentes cereais	36
Tabela 7 - Número de amostras nos diferentes Estados da Região Sul avaliados.....	40
Tabela 8 - Testes bioquímicos realizados para a confirmação de subespécies de <i>B. cereus lato sensu</i>	44
Tabela 9 - Total de isolados positivos e negativos para os genes <i>EntFM, BceT, PipIc, HblA, NheB e Sph.</i>	47

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Presença de <i>B. cereus</i> para amostras de cereais.	37
--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fluxograma do isolamento de <i>B. cereus</i> a partir das amostras de cereais.	29
Figura 2 – Esquema da extração de DNA das amostras de <i>B. cereus</i> isoladas de grãos....	31
Figura 3 - Presença de <i>B. cereus</i> dependente do tempo de armazenamento de cereais.	41
Figura 4 - Presença de <i>B. cereus</i> dependente do tempo de armazenamento de arroz, cevada e feijão.	41
Figura 5 - Presença de <i>B. cereus</i> x tempo médio de armazenamento dos cereais.....	42
Figura 6 - Coloração das células vegetativas e esporos dos cereais estudados.	44
Figura 7 – Gel de agarose representativo dos amplificadores para os genes associados a virulência em <i>B. cereus</i> . Legenda: A) <i>hbla</i> ; B) <i>sph</i> ; C) <i>piplC</i> ; D) <i>bceT</i>	46
Figura 8 –Presença e ausência de genes relacionados com a patogenicidade em <i>B. cereus</i> e dendrograma baseado nas distâncias obtidas a partir destes dados. Cereais: Feijão, Trigo, Cevada, Milho e arroz.	51
Figura 9 - Análise de componentes principais da presença de genes de patogenicidade em isolados de <i>B. cereus</i>	52
Figura 10 – Gel de agarose mostrando os produtos de PCR pelo método REP para os isolados do grupo de trigo.	53
Figura 11 - Dendrograma de comparação de grau de similaridade a partir da análise de dados do BOX, REP e ERIC – PCR para as amostras do grupo de trigo.....	54
Figura 12 - Gel de agarose mostrando os produtos de PCR para o método BOX para os isolados do grupo de milho.....	55
Figura 13 - Dendrograma de comparação de grau de similaridade a partir da análise de dados do BOX, REP e ERIC – PCR para as amostras do grupo de milho.....	56
Figura 14 - Gel de agarose mostrando os produtos de PCR para o método BOX para os isolados do grupo de cevada.....	57
Figura 15 - Dendrograma de comparação de grau de similaridade a partir da análise de dados do BOX, REP e ERIC – PCR para as amostras do grupo de cevada.....	58
Figura 16 - Gel de agarose mostrando os produtos de PCR para o método ERIC para os isolados do grupo de arroz.....	59

Figura 17 - Dendograma de comparação de grau de similaridade a partir da análise de dados do BOX, REP e ERIC – PCR para as amostras do grupo de arroz.....	60
Figura 18 - Gel de agarose mostrando os produtos de PCR para o método REP para os isolados do grupo de feijão.....	61
Figura 19 - Dendograma de comparação de grau de similaridade a partir da análise de dados do BOX, REP e ERIC – PCR para as amostras do grupo de feijão.....	62

RESUMO

DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E MOLECULAR DE *BACILLUS CEREUS* EM GRÃOS

O *Bacillus cereus* é um microrganismo com ampla distribuição na natureza estando presente no solo, poeira e água, sendo caracterizado pela formação de esporos, possui potencial patogênico e deteriorante. Em condições favoráveis, esse microrganismo produz enzimas que confere características sensoriais indesejáveis e produz toxinas numa grande variedade de alimentos, principalmente em cereais e derivados. Estas toxinas produzidas são responsáveis pela ocorrência de intoxicação alimentar. Desta forma, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a presença de *B. cereus* de cereais destinados a produção de alimentos farináceos, realizar o isolamento destas bactérias quando presentes nas amostras testadas e avaliar a presença de genes relacionados aos fatores de virulência nestes isolados. Para tanto foram avaliadas 130 amostras de cereais obtidos de uma empresa processadora de grãos, sendo que deste total, 54 isolados apresentaram positividade para *B. cereus*. Foram realizados os testes bioquímicos de motilidade, hemolisina, decomposição da tirosina, redução do nitrato a nitrito, crescimento rizóide e corpúsculos de inclusão cristalina, para confirmação dos isolados. Dos 54 isolados, 5 foram reclassificados como *Bacillus thuringiensis* e 2 como *Bacillus megaterium*. Quanto a caracterização molecular, todos os isolados foram submetidos a análise de PCR por BOX, REP e ERIC – PCR, visto que nenhuma das técnicas apresentou diferença significativa quanto a separação do *B. cereus*. Os isolados foram avaliados quanto aos fatores patogênicos para os genes *Bcet*, *Piplc*, *NheB*, *EntB*, *HbA* e *Sph*, onde o grupo do arroz foi o que apresentou maior número de genes positivos. Do total dos isolados avaliados, os genes *HbIA* e *NheB* foram os que apresentaram maiores números de isolados positivos. Os dados obtidos nesse trabalho evidenciaram que os genes de patogenicidade de *B. cereus* estão amplamente distribuídos entre os grupos que contaminam os cereais e derivados.

Palavras – chave: alimentos farináceos, enterotoxina, PCR.

ABSTRACT

DETECTION AND CHARACTERIZATION MOLECULAR AND BIOCHEMISTRY OF *BACILLUS CEREUS* IN BEANS

The *Bacillus cereus* is an organism widely distributed in nature and is present in soil, dust and water. This bacterium is characterized by spores formation and food deteriorating and pathogenic potential. Under favorable conditions, this microorganism produces enzymes that confer undesirable sensory characteristics and toxins in a wide variety of foods, mainly in cereals and derivatives. These toxins produced are responsible for the occurrence of food poisoning. This study aims to evaluate the presence and isolate of *B. cereus* on grains for the production of food starches, as well the evaluate the presence of genes related to virulence factors on these isolates. Therefore, it was evaluated 130 samples obtained from a cereal grain processing company, 54 isolates were positive for *B. cereus*. Biochemical tests were realized for motility, haemolysin, tyrosine decomposition, reduction of nitrate to nitrite, type of growth and corpuscles crystalline inclusion. Seven samples of 54 isolates were reclassified as 5 *B. thuringiensis* and 2 *B. megaterium*. As the molecular characterization, all isolates were analyzed by PCR BOX, REP and ERIC - PCR, whereas none of the techniques presented significant difference separating *B. cereus*. The isolates were also evaluated for presence of pathogenic factors genes *Bcet*, *PIPLC*, *NheB*, *EntB*, *HbA* and *Sph*, where the group from rice isolates showed the highest number of positive genes. The *HbA* and *NheB* genes were the most prevalence on the isolates. The data obtained in this study showed that genes for pathogenicity of *B. cereus* are widely distributed among the groups that contaminate cereals and derivatives.

Keywords: farinaceous foods, enterotoxin, PCR

1. INTRODUÇÃO

A preocupação e a exigência do consumidor com a qualidade dos alimentos vêm apresentando um aumento significativo ao longo dos anos. Com isso, a indústria de alimentos tem mostrado crescente preocupação com a segurança alimentar e tem buscado novos processos de industrialização. Entre as características consideradas desejáveis para um alimento, está relacionado ao número de microrganismos que não oferece riscos à saúde. O controle da contaminação microbiana é um fator fundamental para a qualidade e inocuidade do produto, sendo que a contaminação microbiana pode afetar as características sensoriais, reduzir a vida de prateleira, além de tornar o alimento um veículo de microrganismos causadores de doenças.

Durante a produção de alimentos, as práticas de processo podem contribuir para a contaminação dos alimentos por microrganismos. Entre os diversos microrganismos que podem contaminar alimentos, podemos destacar o *Bacillus cereus*, já que é capaz de formar esporos e com isso resistir a processos térmicos utilizados no processamento de diversos alimentos.

O *B. cereus* produz enzimas que confere características sensoriais indesejáveis, além da sua capacidade de formar toxinas numa grande variedade de alimentos, principalmente em cereais e derivados, sendo que essas toxinas formadas são responsáveis pela ocorrência de intoxicação alimentar. Com isso, o estudo de *B. cereus* vem ganhando ênfase pelo seu potencial patogênico e deteriorante.

Os dados existentes no Brasil relacionados à patogenicidade de *B. cereus* em alimentos são escassos, sobretudo envolvendo cereais e derivados. Sendo assim, ter conhecimento do potencial de contaminação desta espécie microbiana em farináceos e avaliar suas características moleculares quanto à capacidade genética de produção de toxinas são informações fundamentais para estabelecer medidas visando a segurança alimentar. Além disso, informações referentes à variabilidade genética e caracterização molecular de *B. cereus* devem auxiliar em estudos epidemiológicos, e consequentemente, a definição de medidas preventivas.

Desta forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar a presença de *B. cereus* em grãos destinados a produção de alimentos farináceos, avaliar a presença de genes

relacionados aos fatores de virulência nestes isolados e caracterizar, através do uso de marcadores moleculares, as populações de *B.cereus* presentes em grãos de trigo, arroz, feijão, cevada e milho.

Objetivos específicos

- Isolar *Bacillus sp.* de alimentos farináceos;
- Identificar os isolados por testes bioquímicos;
- Caracterizar os isolados por métodos moleculares;
- Avaliar a variabilidade genética dos isolados de *B. cereus*;
- Avaliar os fatores de patogenicidade dos *B. cereus* isolados.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Características do *Bacillus cereus*

A taxonomia dentro do gênero *Bacillus* é dificultada pela elevada heterogenicidade nas características genótípicas e fenotípicas deste grupo (Ash *et al.*, 1991; Drobniowski, 1993; Carlson *et al.*, 1996). Devido a estes problemas de classificação tem-se utilizado a denominação de grupo *B. cereus*, também denominado *B. cereus lato sensu*, que compreende *B. cereus* (*B. cereus stricto sensu*), *B. thuringiensis*, *B. anthracis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides* e *B. weithenstephanensis* (Lechner *et al.*, 1998; Bartoszewicz *et al.*, 2008; Guinebretière *et al.*, 2008; Senesi & Ghelardi, 2010).

Atualmente, não existe consenso se diferentes indivíduos do grupo *B. cereus lato sensu* devem ser consideradas espécies separadas ou de uma mesma espécie. Enquanto alguns estudos sugerem que o *B. cereus*, *B. thuringiensis* e *B. anthracis* deveriam ser considerados como uma única espécie, outros autores afirmam ter obtido uma diferenciação genética entre estas espécies (Rasko *et al.*, 2004; Vilas-Boas *et al.*, 2007).

O *B. cereus stricto sensu* é um microrganismo com ampla distribuição na natureza estando presente principalmente em solo, poeira e água. Pode permanecer viável durante longos períodos de tempo no ambiente e nos alimentos, devido a sua capacidade para formar esporos resistentes a condições severas (Rajkowski & Bennett, 2003; Bhunia, 2007).

As bactérias do gênero *Bacillus* são bastonetes gram positivos, caracterizados pela rápida formação de esporos. Os esporos de *B. cereus stricto sensu* são elipsóides e localizam-se na região central ou pericentral da célula. Assim, como ocorre em outras espécies do gênero, os esporos de *B. cereus lato sensu* contém ácido dipicolínico (ácido 2,6-piridinedicarboxílico), essencial na esporulação, germinação e estrutura (Kotiranta *et al.*, 2000; Jaaskelainen, 2008). Os mecanismos de adaptação de *B. cereus stricto sensu* a diversas condições ambientais, contribuem para sua sobrevivência e disseminação no ambiente, sendo que a resistência ao calor está positivamente correlacionada com a temperatura de esporulação (Carlin *et al.*, 2010). Sua temperatura ótima de multiplicação varia de 25 a 37° C, mas já foram identificadas estirpes psicrotólicas e termodúricas

capazes de multiplicar entre 3 e 75° C (Kramer & Gilbert, 1989; Drobniowski, 1993; Dufrenne *et al.*, 1995).

As espécies do grupo *B. cereus lato sensu* podem ser diferenciadas essencialmente devido as suas características fenotípicas. O *B. anthracis* caracteriza-se pela formação de cápsula e pela produção de toxinas, codificadas por genes localizados nos plasmídeos pXO2 e pXO1, respectivamente, responsável pelo carbúnculo hemático em humanos e animais, doença conhecida como antrax. Já o *B. thuringiensis* distingue-se pela produção de uma endotoxina durante a esporulação, que é utilizada comercialmente no controle biológico de insetos. O aparecimento de colônias com crescimento rizoide em ágar é característico de *B. mycoides* e *B. pseudomycoides*, e diferencialmente o *B. weinestephanensis* é uma estirpe psicrotrófica capaz de se multiplicar abaixo de 7° C, mas não a 43° C (Lechner *et al.*, 1998; Arnesen *et al.*, 2008). Assim sendo, para diferenciar o *B. cereus stricto sensu* das demais espécies do grupo (Tabela 1), alguns testes são aplicados como a verificação da produção de cristais de toxinas, motilidade, crescimento rizoide e hemólise (Rhodehamel & Harmon, 1998; Bennet & Belay, 2001; Silva *et al.*, 2010).

Entre as características que distinguem o *B. cereus lato sensu* de outros microrganismos formadores de esporos é a sua incapacidade para produzir ácido a partir do manitol (Fritze, 2004), e, com isso suas colônias ficam cor-de-rosa no meio ágar manitol gema de ovo polimixina (MYP) devido ao vermelho do fenol (Jaaskelainen, 2008). Grande parte das estirpes de *B. cereus lato sensu* são capazes de produzir lecitinase, esta caracterizada pela produção de uma zona de precipitação em torno das colônias. Outra característica é a produção de hemolisina em algumas estirpes de *B. cereus lato sensu*, onde em ágar sangue as suas colônias apresentam um halo de hemólise (Jaaskelainen, 2008).

As células de *B. cereus stricto sensu* possuem cerca de 1,0 e 1,2 µm de largura e 3,0 a 5,0 µm de comprimento e apresentam motilidade associada a flagelos peritríqueos (Kramer & Gilbert, 1989; Rajkowski & Bennet, 2003). Os endósporos são resistentes a extremas condições ambientais, que variam desde o tratamento térmico até desidratação.

Em condições favoráveis, os esporos podem germinar propiciando a multiplicação bacteriana em alimentos processados (Abee *et al.*, 2011).

Tabela 1 – Características bioquímicas diferenciais do grupo *B. cereus lato sensu*

	<i>B. cereus</i>	<i>B. megaterium</i>	<i>B. thurigiensis</i>	<i>B. anthracis</i>	<i>B. mycoides</i>
Coloração Gram	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+
Reação da gema de ovo	+	+	+	+	(+)
Mobilidade	(+/-)	(+/-)	(+/-)	-	-
Produção de ácido a partir do manitol	-	-	-	-	-
Hemólise (eritrócitos de ovelha)	+	-	+	-	(+)
Cristais de toxina	-	-	+	-	-
Utilização anaeróbia da glicose	+	+	+	+	+
Redução de nitrato	V	-	+	+	V
Reação Voges-Proskauer	+	+	+	+	+
Decomposição da tirosina	+	(+/-)	+	(+)	(+)
Resistência à lisozima	+	+	+	+	+
Cápsula	V	-	-	-	+
Hidrólise da ureia	V	V	+	-	V
Sensibilidade à penicilina	-	-	-	+	-
Crescimento rizoide	-	-	-	-	+

Legenda: +, positivo; -, negativo; v, variável; (+/-), normalmente positivo, mas ocasionalmente negativo; (+), a maioria é fracamente positivo.

Adaptado de Bennet e Belay (2001); Rajkowski & Bennet (2003); Bhunia (2007).

O *B. cereus stricto sensu* tem sido isolado numa grande variedade de alimentos processados e *in natura*, entre eles, arroz e massas, fórmulas infantis, vegetais, pimentas, alimentos prontos para consumo, leite e derivados lácteos (Senesi & Ghelardi, 2010; Chaves *et al.*, 2011).

Segundo Shaheen *et al.* (2006), produtos desidratados e farináceos têm mostrado grande potencialidade para a contaminação e desenvolvimento do *B. cereus stricto sensu*.

2.2 Patogenicidade do *B. cereus*

B. cereus stricto sensu podem produzir uma grande variedade de substâncias potencialmente patogênicas, como: hemolisinas, fosfolipases, enterotoxinas, metaloproteases, colagenases, entre outras (Martinez-Blanch *et al.*, 2009).

Sua importância na indústria de alimentos está associada à capacidade de produzir toxinas responsáveis por surtos de enfermidades transmitidas por alimentos (ETA), pela produção de enzimas extracelulares que determinam o potencial de deterioração e/ou também pela formação de esporos termorresistentes (Robinson & Phill, 1987).

De acordo com a Resolução – RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001 da ANVISA, a qual estabelece os padrões microbiológicos para alimentos, o limite máximo permitido para *B. cereus* em farinhas, fubá, pó ou produtos flocados é 3×10^3 UFC/g, sendo que acima deste nível, o consumo destes alimentos é considerado inseguro ou impróprio (Brasil, 2001).

Os surtos de intoxicação geralmente estão associados a falhas na conservação dos produtos mediante exposição a tempos e temperaturas inadequadas, propiciando, assim, que estes microrganismos se multipliquem até níveis significativos ($>10^5$ UFC/g), ressaltando-se que, neste caso, o microrganismo não é responsável pela patologia e sim as toxinas que produz (Forsythe, 2002).

As enterotoxinas do *B. cereus stricto sensu* são produzidas quando o microrganismo cresce a uma temperatura em torno de 32°C, em condições aeróbicas, com um nível de carboidratos próximo a 1% e pH alcalino. Assim sendo, alimentos que contém elevados níveis de amido, frutose ou lactose, quando estocados em temperatura ambiente por longos períodos, estão mais sujeitos ao desenvolvimento de *B. cereus* enterotoxigênicos (Gore *et al.*, 2003).

B. cereus stricto sensu é responsável por dois tipos de doenças de origem alimentar (Tabela 2), uma chamada de síndrome diarréica, provocada por enterotoxinas produzidas no intestino do hospedeiro; e a síndrome emética, uma intoxicação atribuída a uma toxina

pré-formada no alimento (Drobniewki, 1993; Agata *et al.*, 1995; Wijnands *et al.*, 2002; Arnesen *et al.*, 2008; Senesi & Ghelardi, 2010). A síndrome, determinada pela toxina emética, tem um curto período de incubação variando de 0,5 a 6 horas. Enquanto que a síndrome diarréica é caracterizada por um período de incubação de 8 a 16 horas (Granum, 1997).

A toxina emética é produzida geralmente durante o armazenamento prolongado dos alimentos, durante a fase estacionária da curva de crescimento de *B. cereus stricto sensu*, sendo a ingestão destes alimentos contaminados com a toxina pré-formada a causa da manifestação do quadro emético (Arnesen *et al.*, 2008).

A síndrome emética tem sido amplamente associada ao consumo de arroz e massas contaminados com *B. cereus stricto sensu* produtores de cereulida (Kotiranta *et al.*, 2000). Mahler *et al.*, (1997) descreveram um caso de falência hepática fulminante e posterior óbito do paciente dois dias após a ingestão de macarrão contaminado com a cereulida, na Suíça.

Tabela 2 – Características dos tipos de doenças causadas por *B. cereus*

	Síndrome Diarréica	Síndrome Emética
Dose infecciosa	10 ⁵ – 10 ⁷ células/grama	10 ⁵ – 10 ⁸ células/grama
Toxina produzida	No intestino delgado do hospedeiro	Pré-formada nos alimentos
Tipo de toxina	Proteica	Peptídeo cíclico
Período de incubação	8 -16 h (ocasionalmente > 24 h)	0,5 - 6 h
Duração	12 - 24 h (ocasionalmente vários dias)	6 - 24 h
Sintomas	Dor abdominal, diarreia aquosa e ocasionalmente náusea	Náusea, vômito e mal-estar
Alimentos mais frequentemente contaminados	Produtos à base de carne, sopas, vegetais, pudins/molhos e leite/produtos lácteos	Arroz reaquecido várias vezes, macarrão e alimentos prontos

Granum (1997).

A dose infectante é considerada alta para ambas as síndromes. No caso da síndrome diarréica, a dose é de 10⁵ a 10⁷ células ou esporos por grama, enquanto que para a síndrome emética é 10⁵ a 10⁸ células por grama (Granum, 1997). Embora, alguns autores

afirmam que concentrações acima de 10^3 UFC em 1 g ou 1 mL de alimento, são consideradas inseguras para consumo (Choma & Granum, 2002; Martinez-Blanch *et al.*, 2009).

Tanto a síndrome diarréica quanto a emética são geralmente ligeiras e auto-limitantes, porém, casos severos com hospitalização e mesmo morte tem sido relatados (Ehling-Schultz *et al.*, 2006). O *B. cereus stricto sensu* apresenta-se como um agente patogênico associado à toxinfecção alimentar e foi reconhecido na Europa em 1906. As primeiras descobertas foram confirmadas por pesquisadores europeus no início da década de 1950, passando a ser considerado um importante agente de toxinfecção alimentar. O primeiro surto documentado nos Estados Unidos foi em 1969 e na Grã-Bretanha foi registrado em 1971 (Jay, 2000; Rajkowski & Bennet, 2003).

A síndrome emética foi identificada pela primeira vez depois de vários surtos causados pela ingestão de arroz cozido no Reino Unido no início de 1970. Esta doença é causada pela toxina emética (cereulida), produzida nos alimentos antes da ingestão (Kramer & Gilbert, 1989). Os sintomas da doença são náuseas e vômito, ocorrendo apenas algumas horas após a ingestão. Segundo Kramer e Gilbert (1989), o tempo de incubação seria de 1 a 5 horas. Embora, mais recentemente, Ehling – Schultz *et al.* (2004b) tenham relatado que esse período pode ser mais curto (0,5 até 6 horas), sendo que a duração da doença é normalmente de 6 a 24 horas. Diversos casos graves e até mesmo fatais de contaminação alimentar pela toxina emética foram relatados (Mahler *et al.*, 1997; Ehling-Schultz *et al.*, 2004b; Fricker *et al.*, 2007).

A síndrome diarréica é uma toxinfecção causada por células vegetativas, ingerida como células viáveis ou esporos, que produzem enterotoxinas protéicas no intestino delgado e é facilmente confundido com outra doença de origem alimentar, causada por uma bactéria que também é produtora de esporos, o *Clostridium perfringens* (Granum, 1999), já que ambas caracterizam-se por dor abdominal, diarréia e ocasionalmente náuseas e vômitos. Diferente da síndrome emética, a toxinfecção apresenta um tempo de incubação superior a 6 horas, normalmente de 8 a 16 horas, em média 12 horas e duração da doença é normalmente 12 a 24 horas, mas também foram relatados casos que duram vários dias (Kramer & Gilbert, 1989).

Além de toxinfecção alimentar, o *B. cereus stricto sensu* também pode causar infecções sistêmicas e locais (especialmente em pessoas imunodeprimidas, neonatos, toxicodependentes e pacientes com história de feridas traumáticas, cirúrgicas ou cateteres) classificadas como: endoftalmite, queratite e panoftalmite, infecções cutâneas primárias, infecção de feridas ortopédicas, osteomielite, periodontite, infecções pleuropulmonares, endocardite, infecção urinária, meningite pós-operatória (Kotiranta *et al.*, 2000; Rajkowski & Bennet, 2003; Ehling-Schultz *et al.*, 2004a; Bhunia, 2007).

As toxinas consideradas como principais fatores de virulência para a síndrome diarréica são a hemolisina BL (Hbl), enterotoxina não hemolítica (Nhe) e a citotoxina K (CytK). Ainda existem a enterotoxina FM (EntFM), enterotoxina T (BceT) e a hemolisina II (Hly II) que ainda são consideradas como possíveis toxinas diarréicas (Molva, *et al.*, 2009) embora não haja relatos de que elas possam ser causadoras de enfermidades transmitidas por alimentos (Kotiranta *et al.*, 2000; Hendriksen *et al.*, 2006). Além destas, a Fosfolipase C (PipIC) e Esfingomielinase (Sph), componentes da unidade citolítica cereolisina AB, tem sido implicados na síndrome diarréica, atuando sobre a permeabilidade e viabilidade de células do epitélio intestinal (Hergenrother & Martin 1997).

2.2.1. Hemolisina BL (Hbl)

A hemolisina BL (HBL) é um complexo termolábil formado por três polipeptídeos: B, L1 e L2, que são codificados pelos genes *hblA*, *hblC* (codifica a fração L2) e *hblD* (codifica a fração L1). A presença dos três elementos é necessária para a atividade da toxina. Uma mutação no gene *hblA* resultou no aparecimento de um quarto gene (*hblB*), porém a ausência desse gene não impede a atividade biológica da toxina (Lindback & Granum, 2006).

A HBL produz um padrão de hemólise incompleta em ágar sangue, sendo esta característica, associada a sua atividade citotóxica, um importante fator de virulência de *B. cereus* (Hendriksen *et al.*, 2006).

2.2.2. Enterotoxina Não Hemolítica (Nhe)

A enterotoxina não hemolítica (NHE) também é formada por três polipeptídeos: NheA, NheB e NheC sendo codificadas pelos genes *nheA*, *nheB* e *nheC*, respectivamente. Assim como a HBL esta toxina também necessita dos três polipeptídeos para possuir atividade enterotóxica (Jaaklainen, 2008). Estudos recentes indicam que a NheB seja a mais presente nas cepas de *B. cereus* (Arnesen *et al.*, 2008).

2.2.3. Citotoxina K (CytK)

A citotoxina K é uma proteína codificada pelo gene *cytK* e é similar à toxina- β de *Clostridium perfringens*. A CytK pode apresentar duas formas diferentes de acordo com a cepa de *B. cereus*: CytK-1 e CytK-2 (Lund *et al.*, 2000; Hendriksen *et al.*, 2006).

As duas formas da toxina apresentam similaridade de 89% em sua sequência de aminoácidos, porém, uma importante diferença quanto a seus efeitos biológicos. A forma CytK-1 se mostrou mais tóxica para as células intestinais humanas, do que a forma CytK-2. Por esse motivo pode-se assumir que a forma CytK-1 apresenta mais perigo aos consumidores, o que torna importante a diferenciação entre as duas formas nos alimentos contaminados (Guinebretiere *et al.*, 2006).

2.2.4. Enterotoxina BceT

A BceT (*B. cereus enterotoxin T*) é um polipéptido de 41 kDa. A sua função na patogênese é controversa, uma vez que alguns estudos sugerem que tem atividade enterotóxica enquanto outros consideram o inverso pelo fato de não ter sido associado a nenhum surto de toxinfecção alimentar (Bhunja, 2007).

2.2.5. Enterotoxina FM

A enterotoxina FM foi isolada da estirpe *B. cereus* FM-1, causadora de toxinfecção alimentar. Porém, não foi ainda associado a nenhum surto de toxinfecção alimentar. Por outro lado, o gene *entFM* está presente na maioria das estirpes associadas a surtos, sendo o gene de enterotoxina mais prevalente em *B. cereus*, e algumas experiências em laboratório mostraram que a enterotoxina FM purificada causa acúmulo de líquido em modelos de

alça ileal de coelho e de rato, sendo letal em ratos (Rajkowski & Bennet, 2003; Bhunia, 2007).

2.2.6. Cereulida (toxina emética)

A cereulida é termoestável (150°C durante 100 min), ativa numa faixa ampla de pH (pH 2,0 - 11,0) e não é digerida pela pepsina ou pela tripsina. Devido a estas características a toxina não é inativada pelo suco gástrico nem pelas enzimas proteolíticas do trato intestinal e permanece ativa nos alimentos cozidos (Arnesen *et al.*, 2008). Devido ao pequeno tamanho da molécula a toxina emética possui alta estabilidade térmica e química, e não existe maneira de descontaminar alimentos ou matérias primas que contenham a cereulida (Andersson *et al.*, 2004).

A síntese da cereulida ocorre numa faixa de temperatura que varia de 12 a 37°C, porém a produção máxima da toxina parece ocorrer entre 12° e 22°C (Arnesen *et al.*, 2008). Ainda não é claro se a toxina é um produto do gene modificado ou se é produzido enzimaticamente através de modificação dos componentes no meio de crescimento (Granum *et al.*, 1997).

2.2.7. Fosfolipase C (Pip1C) e Esfingomielinase (Sph)

De acordo com a classe de fosfolipídios que atuam tem-se a fosfolipase C específica para fosfatidilinositol (Pip1C) (Ikezawa & Taguchi, 1981) e esfingomielinase (Sph) (Pomerantsev *et al.* 2003). Pip1C e Sph compõem a unidade citolítica cereolisina AB e são codificadas pelos genes *pip1c* e *sph*, respectivamente. A toxicidade de Pip1C pode ser explicada pela hidrólise de diferentes fosfolipídios como fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE) e fosfatidilserina (PS) (Hergenrother & Martin 1997), os quais podem ocorrer nas membranas de células animais. No entanto, a ação da cereolisina AB é dependente da esfingomielinase (Sph), uma vez que a presença de esfingomielinina (SM) em membranas inibe a atividade da Pip1C (Ruiz-Arguello *et al.* 1998). A fosfolipase C específica para fosfatidilinositol (Pip1C) é uma enzima importante na transdução de sinal associada à membrana, agindo na superfície externa da célula para gerar um mensageiro para a transdução de sinal intracelular, clivando fosfatidilinositol ou

glicosilfosfatidilinositol e facilitando a hidrólise entre o glicerol e a cabeça polar dos fosfolípídeos para gerar fosfato-inositol (e derivados) e diacilglicerol (Ikezawa & Taguchi 1981).

2.3. Ocorrência de *B. cereus*

O *B. cereus stricto sensu* tem sido relacionado como causador de diversos surtos de enfermidades de origem alimentar, envolvendo um grande número de alimentos, como por exemplo, arroz, massas, carnes, vegetais, leite e produtos lácteos (Martinez-Blanch *et al.*, 2009). Atualmente concentrações acima de 10^3 UFC/g em 1 g ou 1 mL de alimento são consideradas inseguras para consumo (Choma & Granum, 2002; Martinez-Blanch *et al.*, 2009).

Diferentes ingredientes também já foram identificados como fontes importantes de contaminação. Alguns deles são agentes texturizantes, ovos líquidos, ervas e também temperos e especiarias (Martinez-Blanch *et al.*, 2009).

Doenças causadas por *B. cereus stricto sensu* têm sido subestimadas tanto no Brasil, como em outros países. Este fato se deve a curta duração e a pequena intensidade dos sintomas na maioria dos casos, o que desestimula o paciente a procurar cuidados médicos. Além disso, quando diagnosticada, a doença não é de notificação obrigatória. Adicionalmente, os casos e surtos não podem ser sempre associados a *B. cereus*. Em geral, os sintomas da síndrome emética não são facilmente distinguíveis da intoxicação causada por *Staphylococcus aureus*, sendo que a síndrome diarréica apresenta os mesmos sintomas que a doença causada por *Clostridium perfringens* tipo A (Arnesen *et al.*, 2008). Logo, para o diagnóstico preciso do agente etiológico da enfermidade é necessário que o paciente seja submetido a diferentes exames laboratoriais.

O *B. cereus stricto sensu* pode ser um problema relevante, uma vez que não é eliminado pelos tratamentos de pasteurização e higienização, além de ser consideravelmente resistente à radiação gama (Kotiranta *et al.*, 2000; Ehling-Schultz *et al.*, 2004a). Uma investigação dos surtos de toxinfecção alimentar ocorrido nas Forças Armadas Alemãs identificou o *B. cereus* como o agente patogênico mais prevalente,

responsável por 30% dos casos e 42% dos surtos declarados entre 1985 e 2000 (Ehling-Schultz *et al.*, 2004b).

Na Noruega, Finlândia, Bulgária e Hungria a forma predominante de toxinfecção por *B. cereus* é a síndrome diarréica, enquanto que no Reino Unido, Estados Unidos e Japão a forma emética é predominante. Aliás, no Japão a forma emética está descrita como cerca de 10 vezes mais frequente que a forma diarréica (Granum & Lund, 1997; Kotiranta *et al.*, 2000; Ehling-Schultz *et al.*, 2004b).

O diagnóstico correto da intoxicação por *B. cereus* é importante, pois apesar dos sintomas serem ligeiros e frequentemente passarem após 24 horas, o número de casos com maior gravidade tem aumentado, incluindo uma morte devido à ingestão de alimentos contaminados com a toxina emética (cereulida) e três mortes causadas por citotoxina K (Ehling-Schultz *et al.*, 2004b).

2.4. Características de crescimento das estirpes patogênicas de *B. cereus*

Diferentes estirpes de *Bacillus* spp. podem apresentar comportamentos distintos em diferentes temperaturas. García-Armesto & Sutherland (1997) classificaram essas estirpes em três grupos fisiológicos: um deles claramente psicrotrófico, capaz de se multiplicar a 6,5°C em 10 dias, mas não a 40°C em 2 dias; psicrotrófico intermediário, capaz de se multiplicar a 40°C e a 6,5°C, e outro grupo mesófilo, capaz de se multiplicar a 30°C e a 40°C, mas não a 6,5°C. Lechner *et al.*, (1998) classificaram as estirpes psicrotróficas do grupo *B. cereus* (capazes de se multiplicar entre 4 e 7°C, mas que não se multiplicam a 43°C) como sendo *B. weihenstephanensis*. No entanto, estudos posteriores confirmaram que as estirpes psicrotróficas do *B. cereus lato sensu* não são, necessariamente, *B. weihenstephanensis* (Stenfors & Granum, 2001; Zhou *et al.*, 2010).

Estas características de crescimento fazem com que as estirpes eméticas de *B. cereus stricto sensu* representem um baixo risco em alimentos refrigerados, mas por outro lado, a alta termorresistência dos seus esporos favorece a sua sobrevivência em alimentos sujeitos a tratamento térmico (Ehling-Schultz *et al.*, 2004a; Carlin *et al.*, 2006).

A ocorrência de *B. cereus* psicrotrófico tem relação com as condições climáticas das regiões de onde o mesmo é isolado. Em regiões frias, sua ocorrência é maior do que

nas regiões tropicais, onde *B. cereus* mesófilo representa a maioria das estirpes isoladas (Stetten *et al.*, 1999; Carlin *et al.*, 2010).

Algumas características podem explicar a capacidade de determinadas estirpes de *B. cereus* se desenvolver em baixas temperaturas, por exemplo, a composição dos ácidos graxos da membrana celular. Estirpes psicrotróficas de *B. cereus* têm maiores concentrações de ácidos graxos insaturados na membrana, comparadas às concentrações observadas em microrganismos mesófilos (Cousin, 1982; Carlin *et al.*, 2010). Os ácidos graxos insaturados proporcionam maior fluidez da membrana em baixas temperaturas aumentando a permeabilidade da célula. Portanto, pode-se dizer que a temperatura mínima de multiplicação de *B. cereus* tem relação direta com a composição de ácidos graxos da sua membrana celular (Vaisanen *et al.*, 1991). Foegeding e Berry (1997) induziram *B. cereus* a se adaptar ao frio repicando e incubando a 7°C por 8 semanas e verificaram um aumento significativo na ocorrência de estirpes psicrotróficas após este período de adaptação. A adaptação de *B. cereus* ao frio envolve mecanismos fisiológicos, entre eles, a síntese de proteínas do choque-frio codificadas pelo gene *cspA*. Este gene confere a capacidade de *B. cereus* sobreviver e se multiplicar a baixas temperaturas (Mayr *et al.*, 1996; Francis *et al.*, 1998). Além disso, as estirpes psicrotróficas de *B. cereus* apresentam maior capacidade de germinação e multiplicação em produtos lácteos com alto teor de gordura, devido à hidrofobicidade dos seus esporos (Larsen & Jorgensen, 1997).

Algumas estirpes de *B. cereus lato sensu*, principalmente estirpes eméticas, não exibem a reação típica de precipitação devido à hidrólise da lecitina em ágar MYP e em ágar sangue a hemólise é fraca ou ausente. Estas características podem ser devido a mutações no gene que codifica o regulador pleiotrópico PlcR. Foram descritas distintas mutações no gene *plcR* em algumas estirpes do grupo *B. cereus* que resultaram em fenótipo hemólise e lecitinase negativo. Porém, uma vez que estas estirpes não foram investigadas quanto à produção de toxinas, não se sabe se alguma delas é produtora de cereulida. O uso de meios de diagnóstico baseados na hidrólise da lecitina ou na hemólise pode conduzir a erros de identificação, o que pode ser mais uma contribuição para que se subestime a incidência da toxinfecção alimentar por *B. cereus* (Ehling-Schultz *et al.*, 2004a).

2.5. Diversidade e identificação de *B. cereus*

Nas últimas décadas, verificaram-se aumento significativo no desenvolvimento de técnicas moleculares para a detecção, identificação e caracterização de bactérias patogênicas em alimentos. Avanços nos estudos de biologia molecular propiciaram o desenvolvimento de vários métodos moleculares (Destro, 1995).

Como uma nova alternativa, os métodos moleculares oferecem a possibilidade de uma identificação mais precisa dos isolados de *B. cereus* e demais microrganismos patogênicos e/ou deteriorantes em alimentos (Martinez-Blanch *et al.*, 2009).

As técnicas genóticas referem-se a caracterização do DNA cromossômico, plasmidial ou total de um microrganismo, características estas que são estáveis (Destro, 1995).

As técnicas moleculares têm aplicação direta na detecção e caracterização de bactérias patogênicas em alimentos. Dentre essas, destacam-se as fundamentadas na amplificação de sequências do DNA pela reação em cadeia polimerase (*Polymerase Chain Reaction* – PCR) (Boer & Beumer, 1999; Marlony *et al.*, 2003).

O aprimoramento de técnicas baseadas em PCR possibilitou a inserção destas técnicas para a identificação e tipagem de microrganismos (Boer & Beumer, 1999; Marlony *et al.* 2003).

Por se tratar de um método de análise molecular, a PCR possibilita resultados precisos para o risco potencial do alimento contaminado. Porém, o uso de métodos combinados como PCR e técnicas imunológicas são necessários para confirmação da atividade tóxica de *B. cereus* bem como para demais microrganismos (Molva *et al.*, 2009).

Família de elementos repetitivos intergênicos tem sido descritas em diversas espécies bacterianas (Gillings & Holley, 1997). Esses elementos são seqüências genômicas conhecidas, conservadas, repetitivas e de consenso, denominadas REP (*Repetitive Extragenic Palindromic*), ERIC (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*) e seqüências repetitivas conservadas denominadas simplesmente de BOX (Farber *et al.*, 2001).

Os dados existentes no Brasil relacionados à patogenidade de *B. cereus* em alimentos são escassos, sobretudo envolvendo cereais e derivados. Desta forma, é

importante ter conhecimento do potencial de contaminação desta espécie microbiana em cereais e avaliar suas características moleculares quanto à capacidade genética de produção de toxinas para que se possa garantir a inocuidade e qualidade dos produtos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Avaliação da ocorrência de *B. cereus* em cereais

3.1.1. Obtenção e isolamento de *B. cereus*

Os isolados foram obtidos a partir de análises de rotina realizadas por uma empresa processadora de grãos e farináceos, situada em Caxias do Sul - RS. As amostras dos cereais foram enviadas a um laboratório credenciado para avaliação da presença de *B. cereus*. Foram analisadas um total de 130 amostras de cinco grupos de grãos: trigo, feijão, arroz, cevada e milho (Tabela 3).

Tabela 3 – Tipos de cereais utilizados para a obtenção dos cultivos de *B. cereus*

Tipo de cereal	Número de amostras analisadas
Trigo	21
Feijão	20
Arroz	29
Cevada	27
Milho	33
Total	130

O isolamento de *B. cereus* foi realizado baseado nos Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas, de acordo com a Instrução Normativa nº 62 de 26/08/2003 - SDA/MAPA (Brasil, 2001). Foi pesado 25 g da amostra e adicionado 225 mL da solução salina peptonada 0,1%. Foi homogeneizado por 60 segundos em homogenizador modelo (“*stomacher*”). A partir da diluição inicial 10^{-1} , foram efetuadas as diluições 10^{-2} e 10^{-3} . Inoculou-se sobre a superfície seca do ágar cereus (PEMBA) 0,1mL de cada diluição selecionada. As placas foram incubadas a 30°C por 48 horas. Para leitura foram contadas as colônias azul turquesa e rodeadas por halo de precipitação de lecitina hidrolizada. Foram repicadas em tubos com ágar inclinado e incubou-se a 36°C por 24 horas. Foi feito esfregão e coloração pelo método Gram para verificar a presença de bastonetes curtos

Gram positivos, com extremidades quadradas dispostos em cadeias. O fluxograma das atividades realizadas está representado na Figura 1.

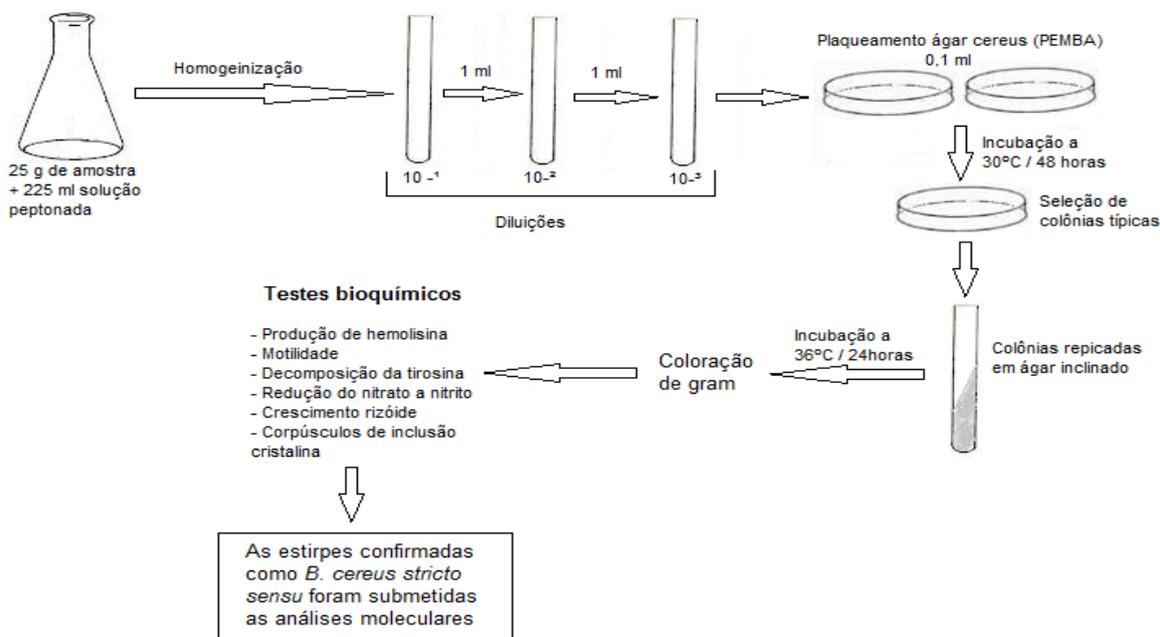


Figura 1 – Fluxograma do isolamento de *B. cereus* a partir das amostras de cereais.

3.1.2. Identificação bioquímica

As colônias isoladas foram submetidas a identificação bioquímica para confirmação do *B. cereus stricto sensu*. As provas bioquímicas foram realizadas conforme os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas, Instrução Normativa nº 62 de 26/08/2003 - SDA/MAPA (Brasil, 2001), sendo que os testes realizados foram os seguintes: coloração de Gram e esporos; produção de α -hemolisina; motilidade em meio semi-sólido; capacidade de decomposição da tirosina e redução do nitrato a nitrito; verificação do tipo de crescimento em superfície de ágar nutriente e da produção de corpúsculos de inclusão cristalina.

A coloração de Gram e coloração de esporos foram realizadas com verde malaquita. A coloração de esporos é uma técnica realizada com corantes, porém, os esporos são difíceis de serem corados visto que há dificuldade em atravessar a sua parede,

neste caso, a técnica utiliza em conjunto o calor, assim consegue-se visualizar nitidamente os esporos.

Para motilidade e redução de nitrato, os isolados foram inoculados com agulha em tubos contendo ágar motilidade-nitrato e incubados a 36°C por 18 a 24 horas. Após, foi verificado o tipo de crescimento presente, e após a leitura da motilidade, foi adicionado 3 gotas de alfa naftilamina 0,5% e 3 gotas de ácido sulfanílico 0,8%. O aparecimento de coloração rosa indicou positividade para redução de nitrato.

Para α -hemólise, as bactérias foram inoculadas pelo método de estria em placa com ágar sangue de carneiro e incubado a 36°C por 24 horas, sendo observada a produção de α -hemólise.

Para a decomposição da tirosina, as bactérias foram inoculadas pelo método de estrias em superfície de Agar tirosina (inclinado em tubo ou distribuído em placas), e incubadas a 36°C por 48 horas. Após foi observado o aparecimento de uma zona clara próxima ao crescimento produzida pela decomposição da tirosina.

Para o crescimento rizóide, foi inoculado sobre a superfície seca de ágar nutriente e incubou-se a 36°C por 72 horas. Após incubação foi verificado o tipo de crescimento, sendo que *B. cereus stricto sensu* não apresenta este tipo de crescimento.

Para verificação da presença de corpúsculos de inclusão cristalina, as culturas suspeitas foram repicadas em ágar nutriente inclinado e deixadas em temperatura ambiente por 3 dias. Foi verificada a presença de corpúsculos de inclusão cristalina e de esporos livres, sendo que o *B. cereus stricto sensu* não produz corpúsculos de inclusão cristalina.

3.2. Avaliação molecular dos isolados de *B. cereus*

3.2.1 Extração do DNA

Para identificação molecular, todas as bactérias foram crescidas em 1 mL do meio LB líquido, por um período entre 18-24 h a 37°C. Após, as amostras foram homogenizadas em vórtex e diluídas em água destilada esterilizada. Desta suspensão de células, foi realizada a etapa de extração do DNA bacteriano.

As culturas de *B. cereus* isoladas foram armazenadas em ágar nutriente e a extração do DNA foi feita segundo a técnica adaptada de Bollet *et al.* (1991). A técnica foi realizada seguindo-se os seguintes passos:

Inicialmente foi feita homogeneização das culturas bacterianas em meio líquido, em agitador tipo vórtex, seguido da transferência de 2 mL das culturas para tubos de reação e centrifugação a 5589,3g por 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante e então foi adicionado 1ml de solução TE (Tris-HCl 10mM, pH 8,0; EDTA 1 mM) e centrifugado a 5589,3g por 5 minutos. Realizou-se novamente o descarte do sobrenadante, adicionando-se 100 µl de solução TE e 50µl de solução SDS 10%, seguido de banho seco por 30 min a 65°C. Após a adição de 500µl de clorofórmio, os tubos foram agitados por 5 minutos em vórtex de mesa e centrifugados a 10955,1g por 10 minutos.

Transferiu-se então o sobrenadante para novos tubos de reação (200 µl) e adicionaram-se 400µl de isopropanol (gelado) seguido de agitação suave dos tubos e armazenamento a -20°C por 30 minutos.

Após, foi feita centrifugação por 10 minutos a 10955,1g descartou-se o isopropanol e após a secagem dos *pellets*, em temperatura ambiente, estes foram ressuspensos em 75 µl de TE. Acrescentou-se 2 µl de solução de RNase, após seguiu-se para o banho seco a 37°C por 2 horas. O esquema de extração do DNA pode ser visualizado na Figura 2.

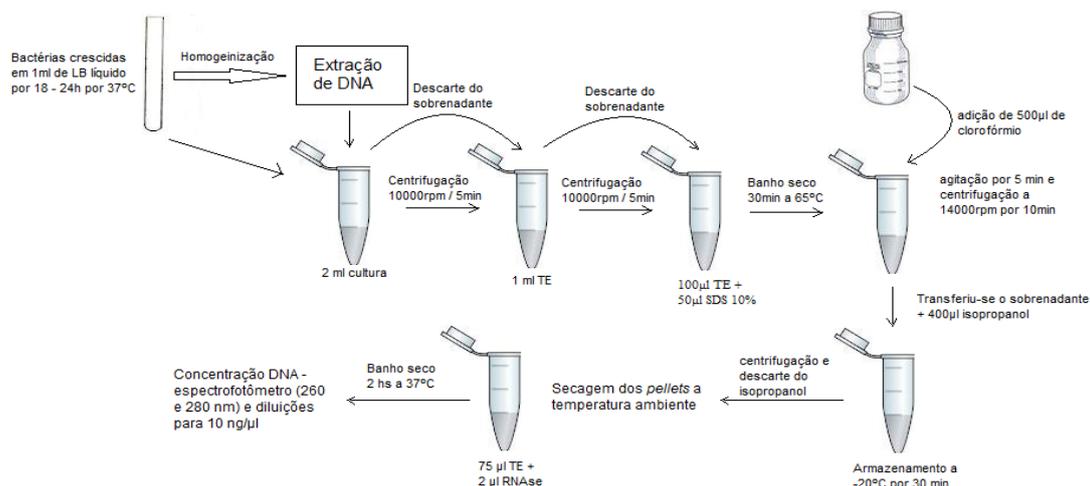


Figura 2 – Esquema da extração de DNA das amostras de *B. cereus* isoladas de grãos (Bollet *et al.*, 1991, modificada).

3.3 Detecção de genes relacionados com a patogenicidade

Para avaliação dos genes de patogenicidade, foi feita uma amplificação utilizando-se 25µl de solução de PCR, preparada com os seguintes volumes: 11,3µl de água MilliQ, 2µl de solução de dNTPs, 1µl de MgCl₂, 1µl de cada *primer* (correspondente aos respectivos genes que são amplificados), 0,2 µl de Taq DNA polimerase, 2,5µl de solução tampão MgCl₂ e 6 µl de DNA.

Os genes avaliados foram *HblA* (hemólise), *NheB* (enterotoxina não-hemolítica), *BceT* (*Bacillus cereus* enterotoxina T), *EntFM* (enterotoxina FM), fosfolipases - fosfatidilinositol e fosfatidilcolina (*Piplc*) e esfingomielinase (*Sph*), conforme apresentado na Tabela 4.

Tabela 4 – Seqüência de nucleotídeos dos *primers* utilizados.

<i>Gene</i>	<i>Primer</i>	<i>Seqüência do DNA (5'-3')</i>	Massa molecular (bp)	<i>Referências</i>
<i>HblA</i>	hblA	GTGCAGATGTTGATGCCGAT ATGCCACTGCGTGGACATAT	623	Heinrichs <i>et al.</i> (1993); Hansen e Hendriksen (2001)
<i>NheB</i>	nheB	CTATCAGCACTTATGGCAG ACTCCTAGCGGTGTTC	769	Granun <i>et al.</i> (1999)
<i>BceT</i>	ET	TTACATTACCAGGACGTGCTT TGTTTGTGATTGTAATTCAGG	428	Ágata <i>et al.</i> (1995)
<i>EntFM</i>	EntA	ATGAAAAAAGTAATTTGCAGG TTAGTATGCTTTTGTGTAACC	1269	Asano <i>et al.</i> (1997)
<i>Piplc</i>	PC105	CGCTATCAATGGACCATGG GGACTATTCCATGCTGTACC	558	Damgaard <i>et al.</i> (1996)
<i>Sph</i>	Ph1	CGTGCCGATTTAATTGGGC CAATGTTTTAAACATGGATGCG	569	Hisieh <i>et al.</i> (1999)

O protocolo de amplificação utilizado para os genes foi o seguinte: ciclo inicial de 3 minutos a 94°C, seguido de 40 ciclos de 25 segundos a 94°C, 45segundos por 55°C e 2 minutos a 72°C com a extensão final de 5 minutos a 72°C, como preconizado por Matarante *et al.* (2004).

3.4. Avaliação dos genes de patogenicidade

Para avaliação dos genes de patogenicidade, uma amostra foi considerada positiva quando se observava a formação de uma banda distinta, indicando que a amostra possuía o gene para a toxina ou um dos seus componentes. Foi utilizado o marcador de massa molecular Gene Ruler™ 100bp Plus DNA Ladder, que é constituído de 13 bandas (3000 a 100 bp). A leitura foi feita em equipamento com sistema UV – UVITEC – BTS 20M, com o uso do software LabImage (www.labimage.net).

3.5. Caracterização molecular de *B. cereus*

A técnica da PCR utilizou como molde para as reações o DNA bacteriano que foi extraído. A concentração do DNA foi avaliada no equipamento por espectrofotômetro (Biochrom, modelo Libra S12) a 260 e 280 nm e posteriormente diluições foram feitas para que todas as amostras apresentassem uma concentração final de 10 ng/μl. Volumes específicos para cada técnica foram transferidos juntamente com uma reação final (tampão, nucleotídeos e Taq polimerase) como material a ser amplificado em PCR.

Para a amplificação do DNA utilizou-se os iniciadores ERIC (ERIC1R 5' ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAC3') e ERIC2 (5'AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG 3'), BOX (BOXA1R 5'CTACGCCAAGGCGACGCCTGACG3') e REP (REPIR-I 5'IIICGICGICATCIGGC 3' e REP2I 5' ICGICTTATGIGGCCTAC 3'). As condições de PCR utilizadas foram as mesmas utilizadas por Versalovic *et al.* (1991) e Versalovic *et al.* (1994) com algumas modificações. A reação foi realizada em um volume de 25 μL contendo as seguintes soluções: água MilliQ, solução de dNTPs, MgCl₂, *primer* (correspondente aos respectivos genes que amplificam), Taq DNA polimerase, solução tampão MgCl₂ e DNA correspondente a cada amostra isolada. As quantidades utilizadas para cada método de amplificação estão representadas na Tabela 5.

Tabela 5 - Métodos de amplificação e respectivas soluções utilizadas.

	BOX – PCR (µl)	ERIC – PCR (µl)	REP – PCR (µl)
Água MiliQ	8,7	8,7	8,7
dNTPs (10mM)	3	3	3
MgCl ₂ (50mM)	1,5	1,5	1,5
<i>Primer 1</i> (10µM)	3	1,5	1,5
<i>Primer 2</i> (10µM)	-	1,5	1,5
Tampão PCR 10x (200mM Tris Hcl, 500mM Kcl)	2,5	2,5	2,5
<i>Taq</i> polimerase (5U\µl)	0,3	0,3	0,3
DNA (10ng\µl)	6	6	6
Volume total	25	25	25

As etapas de amplificação incluíram desnaturação inicial 92°C por 4 minutos; 40 ciclos constituídos de desnaturação 94°C por 1 minuto, anelamento por 1 minuto para os iniciadores REP á 40°C, ERIC á 48°C e BOX a 50°C e extensão 72°C por 5 minutos com um ciclo final de extensão 72°C por 5 minutos. Após o preparo as soluções foram levadas ao Termociclador (Applied, modelo *Veriti – 96 Well*) onde ocorreu a amplificação dos fragmentos do DNA de interesse.

3.6. Separação e avaliação dos segmentos amplificados

Para os resultados da amplificação obtidos por BOX – PCR, REP – PCR e ERIC – PCR, os produtos obtidos foram separados por eletroforese utilizando gel de agarose 1,8% m/v. Já, para os resultados da amplificação obtidos pela avaliação dos genes de patogenicidade, utilizou-se um gel de agarose 1% p/v. Para ambas as análises, utilizou-se tampão TBE 1X (50 mM Tris, 50 mM ácido bórico, 2,5mM EDTA, pH 8,3). As amostras foram coradas com 3µl de brometo de etídio, possibilitando a visualização do deslocamento das amostras no gel. A voltagem utilizada foi de 90 V e o tempo de corrida foi o suficiente para que as amostras percorressem dois terços do gel. Após, foi visualizado em transluminador aonde foi feita a fotodocumentação.

3.7. Análise estatística

Os dados relativos à prevalência foram avaliados através de análise de variância, correlação de Pearson e regressão linear. Já para dos dados moleculares, tanto de genes de patogenicidade como marcadores moleculares foram realizadas análises multivariadas envolvendo o cálculo de índices de similaridade de Jaccard, análises hierárquicas de agrupamentos utilizando o algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) e análise de componentes principais. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa computacional IBM SPSS Statistics 20.0 com nível de significância de 95%.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Avaliação da ocorrência de *B. cereus* em cereais

4.1.1. Isolamento de *B. cereus*

O grupo *B. cereus* foi encontrado em 54 das 130 amostras de cereais analisados, o que corresponde a 41,53%, sendo 6 amostras de trigo (28,6%), 15 amostras de feijão (75%), 19 amostras de arroz (65,5%), 11 amostras de cevada (40,7%) e 3 amostras de milho (9,10%) (Tabela 6).

Tabela 6 - Ocorrência de *B. cereus* nos diferentes cereais

Tipo de cereal	Número de amostras analisadas	Amostras positivas	Percentual (%)
Trigo	21	6	28,6
Feijão	20	15	75
Arroz	29	19	65,5
Cevada	27	11	40,7
Milho	33	3	9,1
Total	130	54	41,5

De acordo com os dados obtidos, para todas as amostras positivas de trigo foram encontrados 2×10^2 UFC/g, já para as amostras positivas de feijão, os resultados variaram de 2×10^2 a 3×10^3 UFC/g, visto que alguns destes apresentaram resultados conforme o limite máximo permitido pela legislação. Para as amostras positivas de cevada, os resultados ficaram entre 2×10^2 e 3×10^3 UFC/g, sendo que as amostras de milho tiveram as menores contagens (1×10^2 e 2×10^2 UFC/g). O grupo das amostras positivas de arroz apresentou maiores contagens (entre 2×10^2 a 4×10^3 UFC/g), visto que algumas amostras deste grupo foram superior ao limite máximo permitido pela legislação de 3×10^3 UFC/g (Quadro 1).

Quadro 1 – Presença de *B. cereus* para amostras de cereais.

Número amostra	Amostra	Resultado	Unidade formadora de colônia (UFC/g)	Tempo de armazenamento (meses)	Estado	Isolados
1	Milho	+	1 x 10 ²	6	PR	1 M
2	Arroz	+	2 x 10 ²	8	RS	1 A
3	Trigo	-	-	3	RS	-
4	Trigo	-	-	4	RS	-
5	Arroz	+	2 x 10 ²	6	RS	2 A
6	Milho	-	-	3	PR	-
7	Milho	-	-	3	PR	-
8	Arroz	+	2 x 10 ²	6	RS	3 A
9	Arroz	+	3 x 10 ²	7	RS	4 A
10	Feijão	-	-	3	SC	-
11	Milho	+	2 x 10 ²	6	PR	2 M
12	Milho	-	-	6	PR	-
13	Trigo	+	2 x 10 ²	8	RS	1 T
14	Milho	-	-	6	PR	-
15	Trigo	+	2 x 10 ²	8	RS	2 T
16	Milho	-	-	5	PR	-
17	Cevada	+	2 x 10 ²	7	RS	1 C
18	Cevada	+	2 x 10 ²	7	RS	2 C
19	Cevada	+	3 x 10 ²	7	RS	3 C
20	Milho	-	-	6	PR	-
21	Arroz	-	-	6	RS	-
22	Trigo	-	-	6	RS	-
23	Cevada	+	2 x 10 ²	8	RS	4 C
24	Cevada	+	2 x 10 ²	7	RS	5 C
25	Cevada	+	1 x 10 ³	9	RS	6 C
26	Milho	-	-	6	PR	-
27	Milho	-	-	4	PR	-
28	Milho	-	-	4	PR	-
29	Cevada	-	-	5	RS	-
30	Trigo	-	-	4	RS	-
31	Cevada	-	-	6	RS	-
32	Feijão	+	2 x 10 ³	8	SC	1 F
33	Feijão	+	2 x 10 ³	8	SC	2 F
34	Cevada	-	-	6	RS	-
35	Cevada	-	-	4	RS	-
36	Trigo	-	-	4	RS	-
37	Trigo	-	-	4	RS	-
38	Feijão	+	3 x 10 ³	4	SC	3 F
39	Feijão	+	3 x 10 ³	5	RS	4 F
40	Milho	-	-	3	PR	-
41	Milho	-	-	4	PR	-
42	Milho	-	-	3	PR	-
43	Arroz	-	-	3	RS	-
44	Cevada	+	2 x 10 ²	7	RS	7 C
45	Feijão	-	-	5	SC	-
46	Arroz	+	3 x 10 ³	8	RS	5 A

Número amostra	Amostra	Resultado	Unidade formadora de colônia (UFC/g)	Tempo de armazenamento (meses)	Estado	Isolados
47	Arroz	+	2×10^2	8	RS	6 A
48	Arroz	+	2×10^2	8	RS	7 A
49	Arroz	+	1×10^3	9	RS	8 A
50	Trigo	-	-	6	RS	-
51	Trigo	-	-	6	RS	-
52	Feijão	+	2×10^2	8	RS	5 F
53	Feijão	+	2×10^2	6	RS	6 F
54	Feijão	+	3×10^3	6	SC	7 F
55	Milho	-	-	4	PR	-
56	Cevada	+	3×10^2	7	RS	8 C
57	Cevada	+	2×10^2	8	RS	9 C
58	Cevada	-	-	7	RS	-
59	Cevada	-	-	6	RS	-
60	Arroz	-	-	6	RS	-
61	Milho	-	-	6	PR	-
62	Feijão	+	3×10^3	8	RS	8 F
63	Feijão	+	2×10^3	7	SC	9 F
64	Feijão	+	3×10^3	8	SC	10 F
65	Feijão	-	-	4	SC	-
66	Cevada	-	-	4	RS	-
67	Cevada	-	-	3	RS	-
68	Trigo	-	-	4	RS	-
69	Milho	-	-	3	PR	-
70	Trigo	+	2×10^2	7	RS	3 T
71	Trigo	-	-	4	RS	-
72	Feijão	-	-	4	SC	-
73	Feijão	+	2×10^2	8	RS	11 F
74	Feijão	+	3×10^3	8	RS	12 F
75	Feijão	+	2×10^2	9	SC	13 F
76	Feijão	+	2×10^2	8	RS	14 F
77	Milho	-	-	4	PR	-
78	Milho	-	-	4	PR	-
79	Arroz	+	4×10^3	8	RS	9 A
80	Arroz	+	4×10^3	8	RS	10 A
81	Arroz	+	2×10^2	9	RS	11 A
82	Cevada	-	-	4	RS	-
83	Cevada	-	-	6	RS	-
84	Cevada	-	-	3	RS	-
85	Trigo	+	2×10^2	7	RS	4 T
86	Trigo	+	2×10^2	8	RS	5 T
87	Trigo	-	-	6	RS	-
88	Trigo	-	-	6	RS	-
89	Arroz	-	-	3	RS	-
90	Cevada	-	-	4	RS	-
91	Trigo	-	-	4	RS	-
92	Milho	-	-	4	PR	-
93	Milho	-	-	3	PR	-
94	Trigo	+	2×10^2	6	RS	6 T

Número amostra	Amostra	Resultado *	Unidade formadora de colônia (UFC/g)	Tempo de armazenamento (meses)	Estado	Isolados *
95	Milho	-	-	5	PR	-
96	Milho	-	-	4	PR	-
97	Arroz	+	1 x 10 ³	7	RS	12 A
98	Arroz	+	2 x 10 ²	8	RS	13 A
99	Arroz	-	-	3	RS	-
100	Arroz	-	-	3	RS	-
101	Milho	-	-	3	PR	-
102	Milho	-	-	2	PR	-
103	Cevada	-	-	2	RS	-
104	Arroz	+	2 x 10 ²	9	RS	14 A
105	Arroz	+	3 x 10 ³	8	RS	15 A
106	Trigo	-	-	5	RS	-
107	Arroz	+	2 x 10 ²	8	RS	16 A
108	Arroz	+	2 x 10 ²	9	RS	17 A
109	Arroz	+	1 x 10 ³	8	RS	18 A
110	Arroz	+	2 x 10 ²	9	RS	19 A
111	Milho	-	-	3	PR	-
112	Milho	-	-	4	PR	-
113	Milho	-	-	4	PR	-
114	Cevada	-	-	5	RS	-
115	Trigo	-	-	6	SC	-
116	Milho	-	-	5	PR	-
117	Cevada	-	-	6	RS	-
118	Cevada	+	2 x 10 ²	9	RS	10 C
119	Cevada	+	2 x 10 ³	9	RS	11 C
120	Cevada	-	-	6	RS	-
121	Milho	-	-	2	PR	-
122	Milho	-	-	3	PR	-
123	Arroz	-	-	5	SC	-
124	Feijão	-	-	5	SC	-
125	Feijão	+	3 x 10 ³	8	SC	15 F
126	Milho	+	2 x 10 ²	8	PR	3 M
127	Milho	-	-	4	PR	-
128	Arroz	-	-	4	SC	-
129	Arroz	-	-	6	SC	-
130	Arroz	-	-	4	SC	-

Legenda: * - (ausência); + (presença); A (amostras de arroz); C (amostras de cevada); F (amostras de feijão); M (amostras de milho); T (amostras de trigo).

Park *et al.*, (2009), relataram a ocorrência de *B. cereus*, onde foram analisadas 293 amostras de cereais, sendo que 73 (25%) continham estirpes de *B. cereus*. Deste total foram encontrados em 15 (37%) de 83 amostras de arroz castanho, 23 (37%) de 63 amostras de arroz glutinoso e 16 (21%) de 76 amostras de cevada. Vasconcellos (2006)

também estudou 30 amostras de barras de cereais e cereais matinais, sendo que duas (10%) amostras de barra de cereais e uma (10%) amostra de cereais matinais apresentaram colônias características de *B. cereus*.

Conforme os dados obtidos no presente estudo, das 130 amostras analisadas, 79 originam-se do Rio Grande do Sul (RS), sendo que deste total 43 (54,4%) foram positivas para *B. cereus*. Para o estado de Santa Catarina (SC), 18 amostras foram avaliadas e 8 (44,4%) apresentaram positividade. Um total de 33 amostras foi avaliado para o estado do Paraná (PR), sendo que 3 (9,10%) apresentaram *B.cereus* (Tabela 7).

Tabela 7 - Número de amostras nos diferentes Estados da Região Sul avaliados.

Estado	Nº de amostras	Amostras negativas - (%)	Amostras positivas - (%)
RS	79	36 - (45,6%)	43 - (54,4%)
SC	18	10 - (55,6%)	8 - (44,4%)
PR	33	30 - (90,9%)	3 - (9,10%)
Total	130	76 - (58,5%)	54 - (41,5%)

Analisando a quantidade de amostras positivas por Estado, observou-se que o maior percentual correspondeu ao Estado do Rio Grande do Sul. Este resultado está relacionado ao tipo de cereal, mas principalmente com o tempo de armazenamento do mesmo. Sendo as amostras de arroz (amostras 79 e 80), com contagens de 4×10^3 UFC/g (Quadro 1).

A Figura 3 mostra a presença de *B. cereus* relacionada com o tempo de armazenamento dos cereais.

A análise de variância permitiu evidenciar diferença significativa ($P < 0,05$) da presença de *B. cereus* dependendo do tempo de armazenamento, com média de $4,38 \pm 1,24$ meses de armazenamento para as amostras negativas e $7,57 \pm 1,24$ meses para as amostras positivas.

Conforme pode ser visualizado na Figura 3, a partir do 7 mês de armazenamento observa-se um importante aumento na prevalência de *B. cereus*.

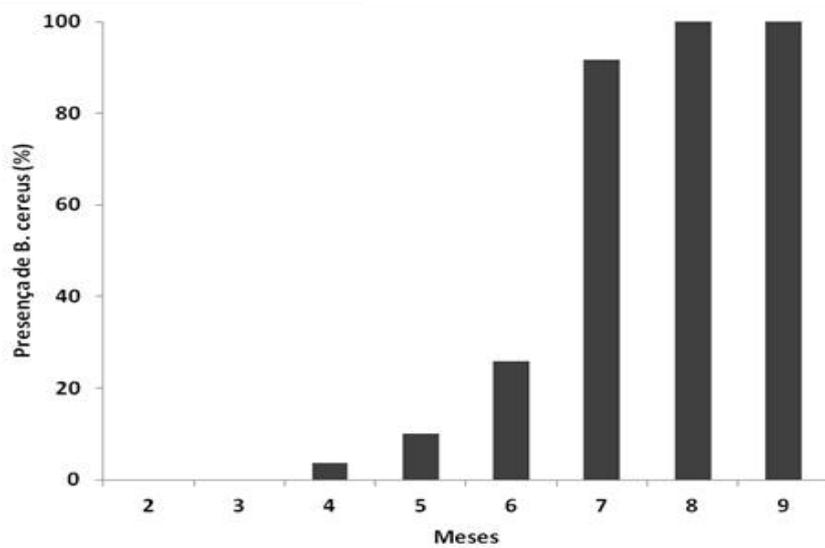


Figura 3 - Crescimento de *B. cereus* dependente do tempo de armazenamento de cereais.

Visando verificar se tal tendência varia dependendo do cereal, foram analisadas independentemente as amostras de arroz, cevada e feijão (Figura 4).

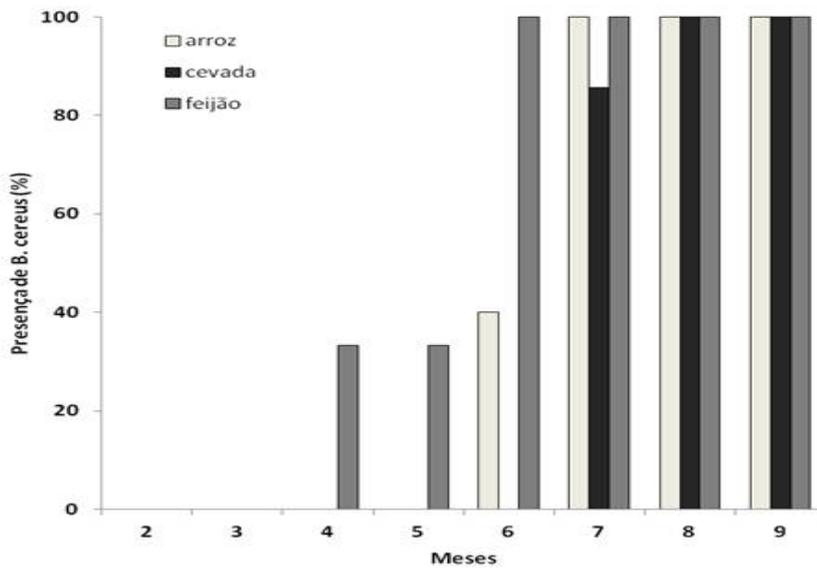


Figura 4 - Presença de *B. cereus* dependente do tempo de armazenamento de arroz, cevada e feijão.

A tendência de aumento da presença de *B. cereus* com o tempo de armazenamento ocorre em todos os cereais, entretanto, no caso das amostras de feijão, *B. cereus* é detectado em amostras com apenas 4 meses, enquanto em arroz e cevada esta bactéria foi detectada a partir do 6 e 7º mês de armazenamento, respectivamente. A ocorrência precoce de *B. cereus* em amostras de feijão pode ser atribuída a forma de armazenamento, a qual no caso de feijão ocorre geralmente em sacos, sem controle de umidade e temperatura, propiciando o crescimento bacteriano, enquanto nos outros cereais avaliados, o armazenamento é realizado geralmente a granel em silos com controle de umidade, restringindo o desenvolvimento das populações microbianas.

Análise de correlação de Pearson entre o tempo de armazenamento médio de cada um dos tipos de cereais analisados e presença de *B. cereus* no conjunto das 130 amostras analisadas foi de 0,918, confirmando a tendência de aumento da presença de *B. cereus* em decorrência do tempo de armazenamento (Figura 5).

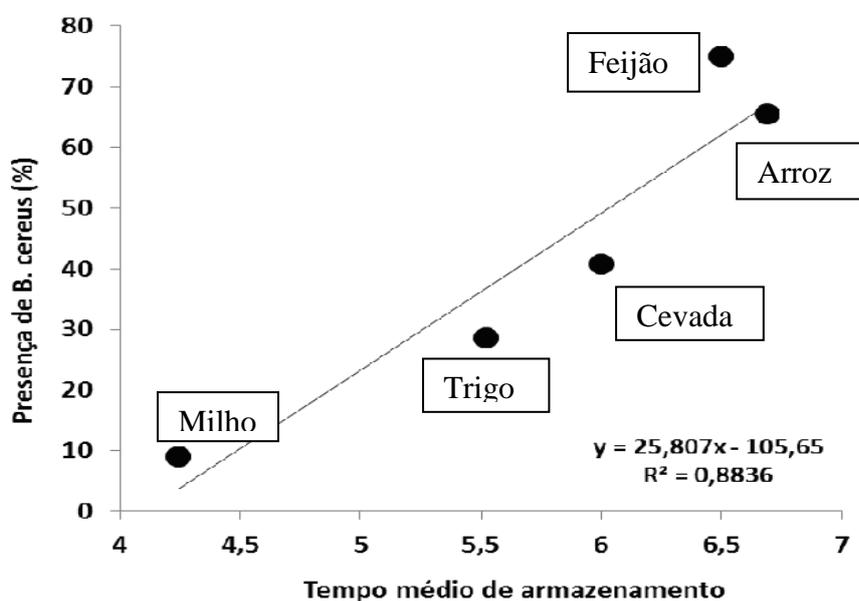


Figura 5 - Presença de *B. cereus* em função do período de armazenamento dos grãos.

De acordo com os dados observados, verificou-se que o tempo de armazenamento foi um fator que contribuiu para o desenvolvimento de *B. cereus* nos cereais. A análise de correlação apresentou uma linearidade quando visualizado para o milho, trigo, cevada e

arroz, sendo que o feijão apresentou o maior percentual de *B. cereus* relacionado com o tempo médio de armazenamento, isso ocorreu devido à forma de armazenamento desse cereal.

4.1.2. Identificação bioquímica

Os isolados foram submetidos a uma série de testes bioquímicos com o objetivo de confirmar e diferenciar *B. cereus stricto sensu* dos demais membros do grupo. Os testes realizados foram: coloração de Gram e esporos, decomposição da tirosina, motilidade, redução a nitrato, hemolisina, crescimento rizoide e corpúsculos de inclusão cristalina.

A coloração de Gram foi realizada a fim de confirmar se as bactérias em estudo eram Gram positivas, visto que todos os isolados testados apresentaram-se Gram positivos, sendo característico do grupo *B. cereus*. A Figura 6 representa os aspectos das células vegetativas e esporos da cevada, feijão e arroz. Um maior número de células e esporos pode ser observado na Figura 6C do arroz, sendo que este cereal apresentou o maior número de amostras positivas para *B. cereus* com até 4×10^4 UFC/g. A Figura 6B representa o feijão, que por sua vez também mostra uma grande quantidade de células e esporos. Também pode ser observada na Tabela 8 a confirmação para o teste de coloração de esporos, onde todos os isolados apresentaram a presença de esporos.

Para os testes de decomposição da tirosina, motilidade, redução a nitrato, hemolisina, crescimento rizoide e corpúsculos de inclusão cristalina, os dados mostram que dos 54 isolados, 47 (87%) apresentaram características típicas de *B. cereus stricto sensu* e 7 (13%) isolados foram classificados como pertencentes ao grupo *B. cereus* (Tabela 8).

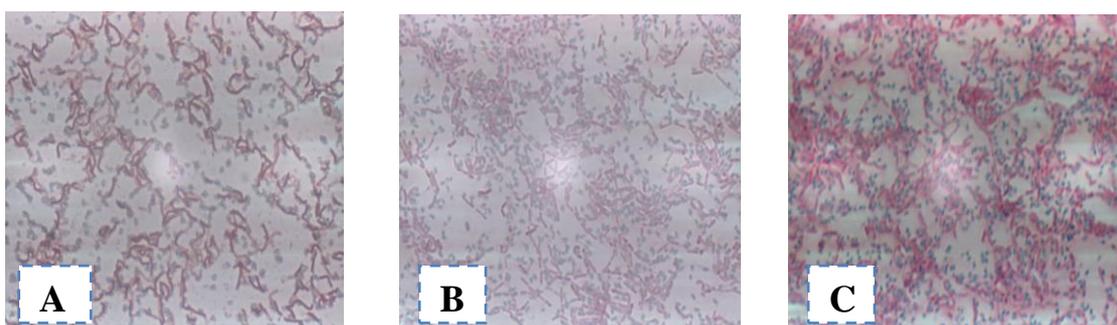


Figura 6 – Aspecto da coloração das células vegetativas e esporos para os isolados 3C (A), 8F (B) e 6A (C).

Dos 54 isolados positivos para *B. cereus*, 7 isolados apresentaram classificação característica de *B. thuringiensis* e *B. megaterium*. Visto que estão representados pelos isolados 4A, 8A, 4C, 6C e 12F pertencentes ao *B. thuringiensis* e os isolados 2T e 5F a *B. megaterium*.

Tabela 8 - Testes bioquímicos realizados para a confirmação de subespécies de *B. cereus lato sensu*

Isolados	Color. esporos	Decomp. tirosina	Motilidade	Redução a nitrato	Hemolisina	Cresc. Rizóide	Corp. inclusão cristal.	Espécies
1 M	+	+	-	+	+	-	-	<i>B. cereus</i>
2 M	+	+	-	+	+	-	-	<i>B. cereus</i>
3 M	+	+	+	+	+	-	-	<i>B. cereus</i>
1 A	+	+	-	+	+	-	-	<i>B. cereus</i>
2 A	+	+	-	+	+	-	-	<i>B. cereus</i>
3 A	+	+	-	+	+	-	-	<i>B. cereus</i>
4 A	+	+	+	+	+	-	+	<i>B. thuringiensis</i>
5 A	+	+	+	+	+	-	-	<i>B. cereus</i>
6 A	+	+	+	+	+	-	-	<i>B. cereus</i>
7 A	+	+	+	+	+	-	-	<i>B. cereus</i>
8 A	+	+	+	+	+	-	+	<i>B. thuringiensis</i>
9 A	+	+	+	+	+	-	-	<i>B. cereus</i>
10 A	+	+	+	+	+	-	-	<i>B. cereus</i>
11 A	+	+	+	+	+	-	-	<i>B. cereus</i>
12 A	+	+	+	+	+	-	-	<i>B. cereus</i>
13 A	+	+	+	+	+	-	-	<i>B. cereus</i>
14 A	+	+	+	+	+	-	-	<i>B. cereus</i>
15 A	+	+	+	+	+	-	-	<i>B. cereus</i>
16 A	+	+	-	+	+	-	-	<i>B. cereus</i>
17 A	+	+	+	+	+	-	-	<i>B. cereus</i>
18 A	+	+	+	+	+	-	-	<i>B. cereus</i>
19 A	+	+	+	+	+	-	-	<i>B. cereus</i>
1 T	+	+	+	+	+	-	-	<i>B. cereus</i>
2 T	+	+	+	-	-	-	-	<i>B. megaterium</i>
3 T	+	+	+	+	+	-	-	<i>B. cereus</i>
4 T	+	+	+	+	+	-	-	<i>B. cereus</i>
5 T	+	+	+	+	+	-	-	<i>B. cereus</i>
6 T	+	+	+	+	+	-	-	<i>B. cereus</i>
1 C	+	+	+	+	+	-	-	<i>B. cereus</i>

2 C	+	+	-	+	+	-	-	<i>B. cereus</i>
3 C	+	+	+	+	+	-	-	<i>B. cereus</i>
4 C	+	+	+	+	+	-	+	<i>B.thuringiensis</i>
5 C	+	+	+	+	+	-	-	<i>B. cereus</i>
6 C	+	+	+	+	+	-	+	<i>B.thuringiensis</i>
7 C	+	+	+	+	+	-	-	<i>B. cereus</i>
8 C	+	+	+	+	+	-	-	<i>B. cereus</i>
9 C	+	+	+	+	+	-	-	<i>B. cereus</i>
10 C	+	+	+	+	+	-	-	<i>B. cereus</i>
11 C	+	+	+	+	+	-	-	<i>B. cereus</i>
1 F	+	+	+	+	+	-	-	<i>B. cereus</i>
2 F	+	+	+	+	+	-	-	<i>B. cereus</i>
3 F	+	+	+	+	+	-	-	<i>B. cereus</i>
4 F	+	+	+	+	+	-	-	<i>B. cereus</i>
5 F	+	+	+	-	-	-	-	<i>B.megaterium</i>
6 F	+	+	-	+	+	-	-	<i>B. cereus</i>
7 F	+	+	-	+	+	-	-	<i>B. cereus</i>
8 F	+	+	+	+	+	-	-	<i>B. cereus</i>
9 F	+	+	+	+	+	-	-	<i>B. cereus</i>
10 F	+	+	+	+	+	-	-	<i>B. cereus</i>
11 F	+	+	+	+	+	-	-	<i>B. cereus</i>
12 F	+	+	+	+	+	-	+	<i>B.thuringiensis</i>
13 F	+	+	+	+	+	-	-	<i>B. cereus</i>
14 F	+	+	+	+	+	-	-	<i>B. cereus</i>
15 F	+	+	+	+	+	-	-	<i>B. cereus</i>

Legenda: + positivo, - negativo

Os isolados pertencentes ao grupo *B. cereus* (*B. thuringiensis* e *B. megaterium*), foram classificados por apresentarem algumas características diferenciadas do *B. cereus stricto sensu*, como a formação de corpúsculos de inclusão cristalina característico de *B. thuringiensis* e a não redução a nitrato e não produção de hemolisina o que caracteriza os isolados de *B. megaterium*.

Pelo fato de *B. cereus stricto sensu* possuir características similares a outros membros do grupo como é o caso de *B. thuringiensis* e *B. megaterium*, pode-se verificar a dificuldade de separação desses microrganismos. A diferenciação entre *B. cereus stricto sensu* e *B. thuringiensis* é de grande importância quando se trata de contaminação alimentar, visto que os cristais de toxinas de *B. thuringiensis* estão sendo utilizados como bioinseticidas e sendo assim, podem ser um veículo de contaminação alimentar (Damgaard, 1995), não somente em cereais, mas em diversos alimentos.

4.2. Presença de genes associados a patogenicidade em isolados de *B. cereus*

Os 54 isolados de *B. cereus* foram avaliados quanto a presença dos genes *EntFM*, *Bcct*, *Piplc*, *HblA*, *NheB* e *Sph* associados a virulência nos isolados estudados.

Pode-se visualizar na Figura 7, alguns géis de agarose que mostram os produtos de PCR com a presença de alguns dos genes associados a patogenicidade.

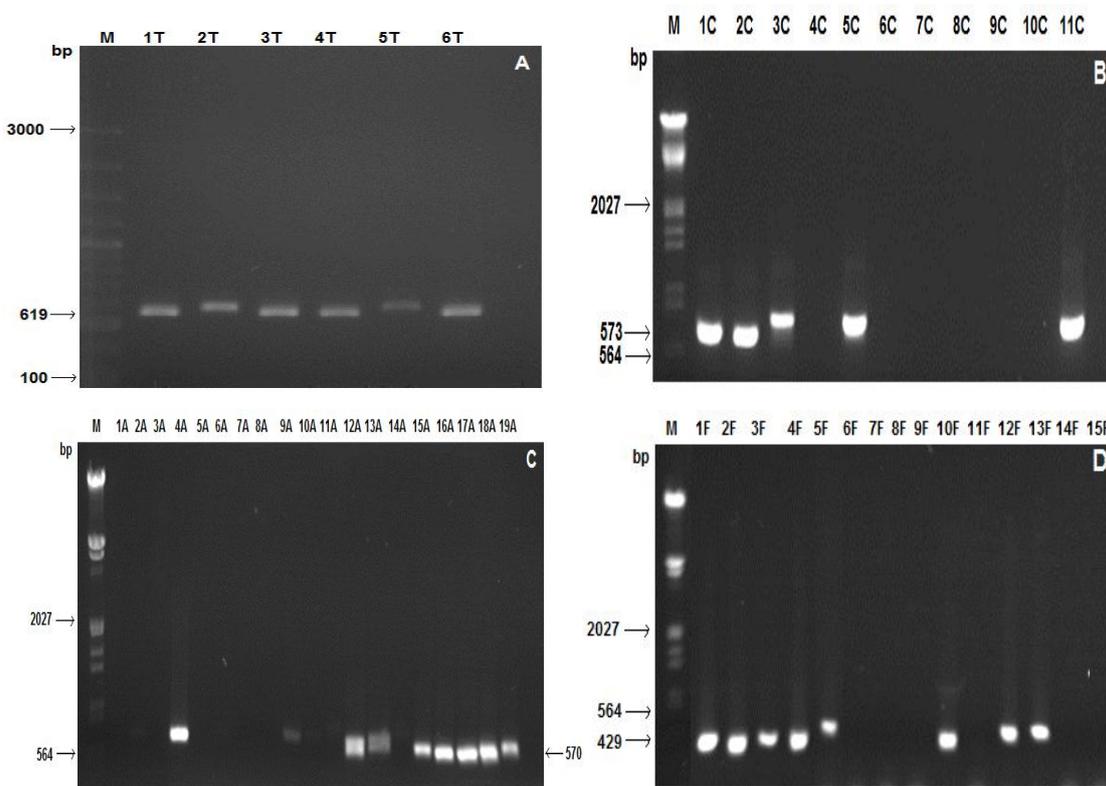


Figura 7 – Gel de agarose representativo dos amplificadores para os genes associados a virulência em *B. cereus*. A) *hblA*; B) *sph*; C) *piplC*; D) *bceT*.

De acordo com os dados obtidos neste estudo, as bandas visualizadas nos géis (Figura 7) apresentaram nitidez e os genes avaliados tiveram fragmentos de amplificação de tamanhos esperados.

Os resultados apresentados na Tabela 9 representam os números de isolados positivos e negativos para os genes estudados.

Tabela 9 - Total de isolados positivos e negativos para os genes *EntFM*, *BceT*, *Piplc*, *HblA*, *NheB* e *Sph*.

Genes	Nº de isolados positivos (%)	Nº de isolados negativos (%)
<i>EntFM</i>	25 (46,3%)	29 (53,7%)
<i>Bcet</i>	28 (51,9%)	26 (48,1%)
<i>Piplc</i>	28 (51,9%)	26 (48,1%)
<i>HblA</i>	31 (57,4%)	23 (42,6%)
<i>NheB</i>	32 (59,3%)	22 (40,7%)
<i>Sph</i>	25 (46,3%)	29 (53,7%)

Cabe ressaltar que ocorreu presença de genes de patogenicidade em isolados de *B. thuringiensis*, com isso supõem-se que pode haver possibilidade de transferência gênica entre *B. cereus sensu stricto* e *B. thuringiensis*, isto associado a presença conjunta destas bactérias, sendo que pode estar relacionado com o uso indiscriminado de *B. thuringiensis* no controle biológico. Um estudo realizado por Vilas-Boas *et al.* (2002), verificou que populações de *B. thuringiensis* e *B. cereus* eram geneticamente mais semelhantes entre si do que quando comparado a outras espécies de *Bacillus*. Também foi evidenciado através de dados eletroforéticos e hemolítico, que estes fornecem evidências para um elevado nível de troca genética dentro de cada uma dessas espécies. Em outro estudo realizado por Helgason *et al.* (1998) a diversidade genética foi avaliada entre 154 isolados de *B. cereus* e *B. thuringiensis* a partir de amostras de solo. A análise de agrupamento revelou dois grandes grupos (I e II), separados a uma distância genética maior do que 0,55. O grupo I incluiu 62 tipos eletroforéticos provenientes de todos os locais, enquanto que, no grupo II, todos eram do mesmo local, a partir dos dados foi concluído que *B. cereus* e *B. thuringiensis* a partir do solo apresentaram um elevado grau de recombinação.

A diversidade genética também foi estudada por Helgason *et al.* (2000), onde avaliaram 35 isolados de *B. cereus* e *B. thuringiensis*, a partir de infecções humanas, sendo que estes foram comparados a outros 30 isolados provenientes de amostras de leite. Os resultados mostraram que a diversidade genética de cada grupo de origem dos isolados variou de 0,241 (infecção humana) para 0,534 (laticínios). A análise de agrupamento

revelou dois grandes grupos separados a uma distância genética maior do que 0,6. Este estudo indicou baixa diversidade genética entre *B. cereus* e *B. thuringiensis* de isolados de pacientes, mas alta diversidade genética entre os isolados de amostras de leite.

Considera-se relevante a presença dos genes de virulência *nheB* (32 amostras) e *hblA* (31 amostras), já que estes foram os que apresentaram o maior número de amostras positivas. Arnesen *et al.* (2008), relata que as enterotoxinas *HblA* e *NheB* são considerados como sendo o principal fator de virulência de *B. cereus* relacionada com intoxicação alimentar. Park *et al.* (2009), avaliaram *B. cereus* isolados de cereais, e estes apresentaram elevada frequência de *NheA* (99%) e *HblD* (84%). Sendo que dos isolados *hblD* positivos, 93% produziram enterotoxina *Hbl*.

Abriouel *et al.* (2007) avaliaram estirpes de *B. cereus* e encontraram 62,8% positivas para os genes *Hbl*, as estirpes isoladas de alimentos fermentados na África, mostraram uma frequência muito baixa destes genes, apenas um em 26 cepas.

Os resultados apresentados no presente estudo para o gene *Piplc* com tamanho de amplificado de 570bp e *BceT* com 429bp (Tabela 10) foram encontrados em 28 isolados (51,9%), visto que, os maiores números para o gene *Piplc* foram identificados em isolados de trigo, onde de um total de 6 isolados, 5 foram positivos para este gene, isso mostra o potencial patogênico destes isolados. Todos os isolados provenientes de trigo foram positivos para o gene *bceT*.

Boonchai *et al.* (2008) isolou *B. cereus* de 6 tipos de alimentos e caracterizou para o gene *Piplc*, sendo que todos os isolados foram positivos para amplificação desse gene. A fosfolipase é conhecida por causar a degradação da célula e membranas de mucosas, os quais são ricos em fosfolípidos, levando à necrose e também é considerada como um fator de virulência (Kotiranta *et al.*, 2000).

Em outro estudo realizado por Matarante *et al.* (2004), 56 estirpes foram testadas para toxinas e fatores de virulência presentes em *B. cereus*. A presença de genes de principal importância responsáveis por intoxicação alimentar diarreica são *Hbl*, *Nhe* e *BceT*, também foi investigada a *entFM*. Além disso, duas enzimas de *B. cereus* (*Sph* e *Piplc*), cujo papel na origem de doença alimentar não é bem conhecido, também foram estudadas. As análises de sequências de fragmentos de DNA amplificado a partir das

estirpes de controle positivo mostraram que eles exibiram um alto grau de identidade (97 a 100%) com os genes de virulência de *B. cereus*. A análise molecular das cepas de *B. subtilis*, *B. pumilus* e *B. amyloliquefaciens* isoladas de alimentos industrializados, mostraram que todos os isolados foram desprovidos destas enterotoxinas.

Num estudo realizado por Agata *et al.* (1995) foi utilizado o gene *BceT* para amplificar isolados de *B. cereus*, sendo que 41 das 84 cepas de *B. cereus*, duas das três linhagens de *B. mycooides* e 8 das 9 estirpes de *B. thuringiensis* geraram os produtos de PCR esperados com tamanho do amplificado igual a 428 pb. Granum *et al.* (1999) testaram 80 cepas de *Bacillus* spp. incluindo 58 do grupo *B. cereus* e encontrou que apenas uma estirpe modelo do gene *BceT*. Em contraste, no presente estudo mostra que a proporção de estirpes de *B. cereus* que possuem o gene *Bcet* (429 bp) foi superior, isto é, 48,1% do total de 54 estirpes de *B. cereus*, sendo que dos 6 amostras de trigo, 100% foram positivos para o gene e das 19 amostras de arroz, 11 apresentaram positividade.

Outro fator de virulência associado a isolados de *B. cereus* foi o da atividade da esfingomielinase, *Sph*, (Beecher e Wong, 2000), visto que neste estudo foi observado em 25 (46,3%), destacando-se as amostras de trigo, com 4 positivas; 5 para cevada; 8 positivos para arroz e 2 para milho. Esses resultados foram semelhantes aos dados obtidos por Oda *et al.*, (2010), onde avaliaram 32 amostras, sendo estas negativas para *Hbl*, porém isso sugeriu a produção de outros produtos como a esfingomielinase (*Sph*), como ocorreu no grupo do milho, onde obteve-se 2 isolados para *Sph* e nenhum isolado para *HblA*.

No presente estudo também foi avaliado o fator de virulência *entFM* (1263bp), onde foi encontrado em 25 isolados (46,3%), deste total, 10 isolados pertencem ao grupo do arroz e para o grupo do trigo, apenas 1 dos 6 isolados foi negativo para este gene.

No trabalho apresentado por Boonchai *et al.* (2008), a enterotoxina FM e o gene *entFM* foram alvos do estudo. Dez isolados de *B. cereus* e estirpe de referência de *B. cereus* ATCC 14579 foram positivos. Estudos de PCR revelaram a presença de fragmentos de DNA que codificam o gene *entFM*. Hsieh *et al.* (1999) relataram que 27 de 28 amostras de alimentos e todos os 30 surtos associados foram positivos para o gene *entFM*. Assim, o gene *entFM* foi encontrado como sendo o mais prevalente para o grupo *B. cereus*. No presente estudo, obteve-se uma semelhança para este gene, onde de 6 isolados de trigo, 5

foram positivas para o gene. Asano *et al.* (1997) relataram uma distribuição comum do gene *entFM* em *B. cereus*. Neste caso, os autores poderiam estar considerando que o gene *entFM* parece ser um gene alvo de diagnóstico apropriado para avaliar o potencial enterotóxico de estirpes de *Bacillus*. Os estudos de intoxicação diarréica pelo gene *entFM* não tem sido bem investigados, os dados de investigação a respeito de intoxicação diarréica por este gene no grupo *B. cereus*, tem sido limitado em comparação a estudos dos outros genes (Boonchai *et al.*, 2008).

Dentre os isolados que apresentam positividade para todos os genes estudados, estão os constituintes dos grupos de feijão (1F, 2F, 3F e 4F), trigo (3T e 6T), cevada (5C) e arroz (15A, 16A, 17A e 18A). De acordo com os resultados obtidos pode-se afirmar que os isolados possuem elevado potencial patogênicos. Em contrapartida, foram obtidos isolados (2M, 1A, 8A, 7C, 8C, 9C, 10C, 6F, 7F, 9F e 15F) que não apresentaram positividade para nenhum dos genes estudados, desta forma, considera-se que não possuem potencial patogênico.

A diversidade genética e potencial patogênico diferem entre as cepas isoladas de cereais. Estes resultados fornecem informações importantes sobre perfis de toxinas de genes de cereais associada ao *B. cereus* para estudos populacionais. Os dados obtidos nesse trabalho evidenciam que os genes de patogenicidade de *B. cereus* estão amplamente distribuídos entre os grupos que contaminam os cereais e derivados. Com isso foi realizada uma análise da presença de amplificadores que permite evidenciar a separação de dois grupos (Figura 8).

A análise hierárquica baseada na presença de amplificadores para os genes de patogenicidade dos isolados de *B. cereus* permite evidenciar a separação de dois grupos (Figura 8). O primeiro formado por 26 isolados os quais, conforme pode ser visualizado no quadro da Figura 8, apresentam baixo número de genes amplificadores e/ou ausência do amplificador correspondente ao gene *EntFM*. O segundo grupo é formado pelos 28 isolados restantes, caracterizados pela presença de um número elevado de genes de patogenicidade amplificadores. Considerando que quanto maior o número de genes de patogenicidade maior o potencial toxi-infeccioso dos isolados, os resultados indicam a presença de dois grupos, um de baixo e outro de elevado risco. Cabe observar, que enquanto os isolados obtidos de

feijão, arroz, milho e cevada encontram-se distribuídos nos dois grupos, os seis isolados obtidos de trigo foram agrupados no grupo 2 de alto risco.

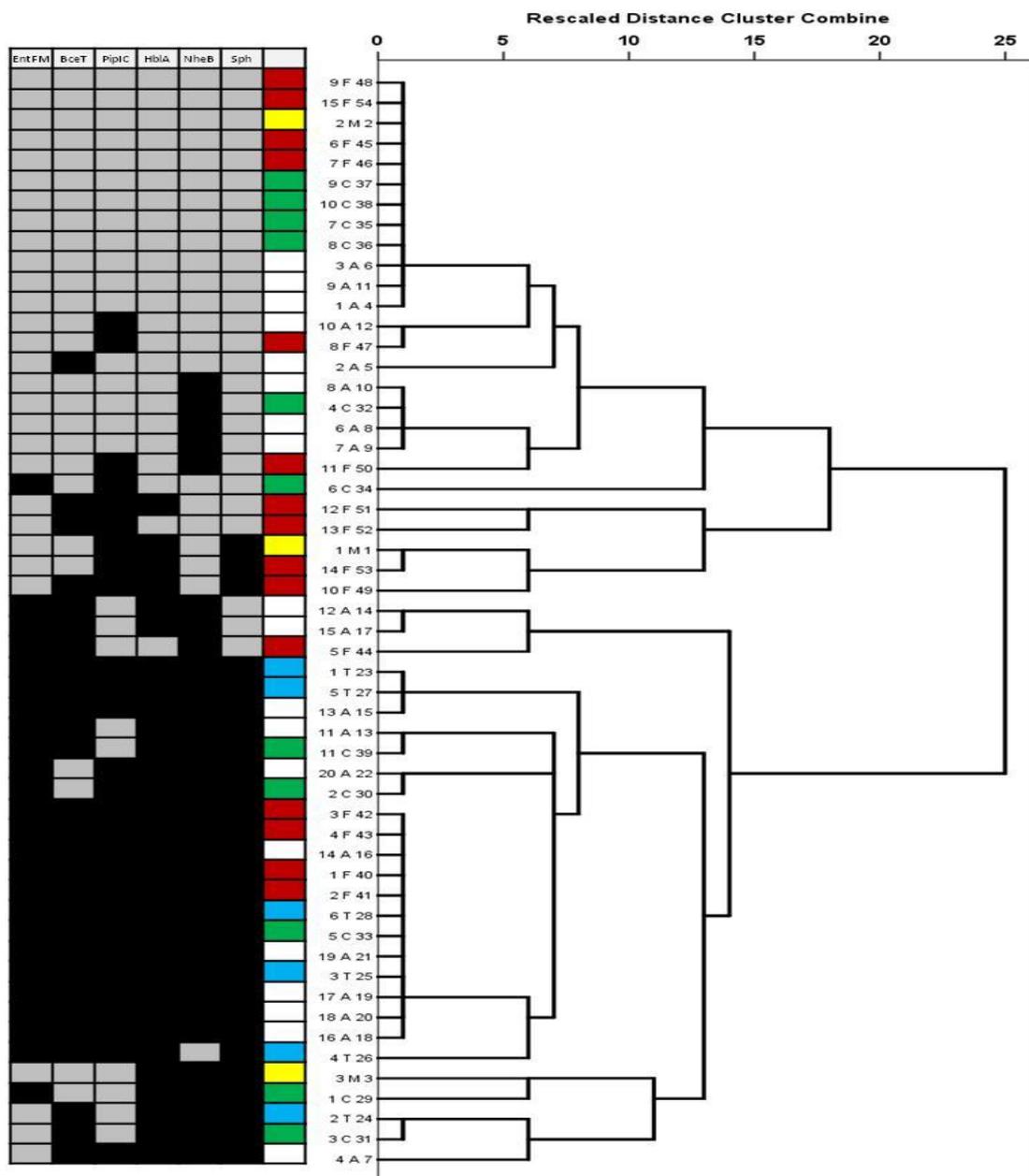


Figura 8 – Presença (■) e ausência (□) de genes relacionados com a patogenicidade em *B. cereus* e dendrograma baseado nas distâncias obtidas a partir destes dados. Cereais: Feijão (■), Trigo (■), Cevada (■), Milho (■) e arroz (□).

A Figura 9 representa a análise dos componentes da presença de genes de patogenicidade em isolados de *B. cereus*.

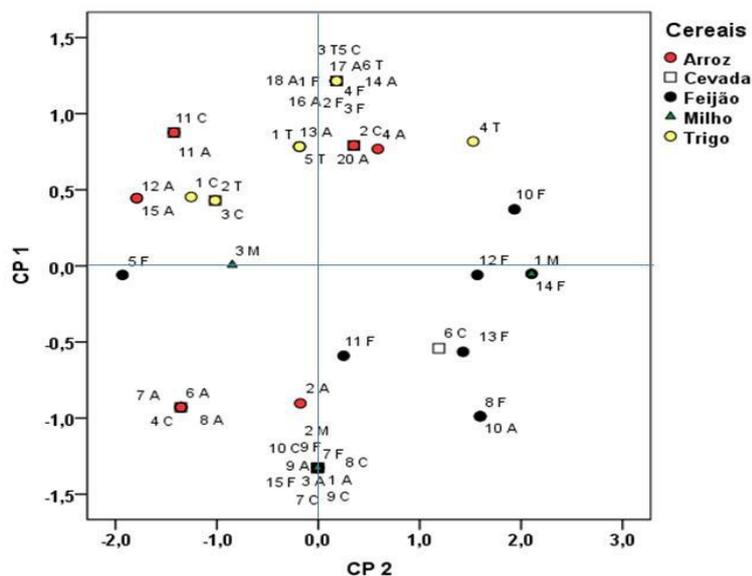


Figura 9 - Análise de componentes principais da presença de genes de patogenicidade em isolados de *B. cereus*.

A Figura 9 mostra a dispersão dos isolados de *B. cereus* com base na presença de genes de patogenicidade. A dispersão obtida coincide com a separação de grupos através da análise hierárquica (Figura 8), sendo que o componente 1 separa basicamente os dois grandes grupos e o componente 2 os subgrupos. O componente 1 que representa 60,7% da variância está correlacionado com a presença de amplificadores para os genes *Hbla* (0,92), *EntFM* (0,82) e *BceT* (0,78), enquanto o componente 2 que representa 14,02% da variância está correlacionado com a presença do gene *Piplc* (0,68) e ausência do gene *NheB* (-0,56).

4.3. Caracterização molecular dos isolados do *B. cereus*

A Figura 10 representa os produtos de PCR para os isolados REP utilizando os isolados do trigo.

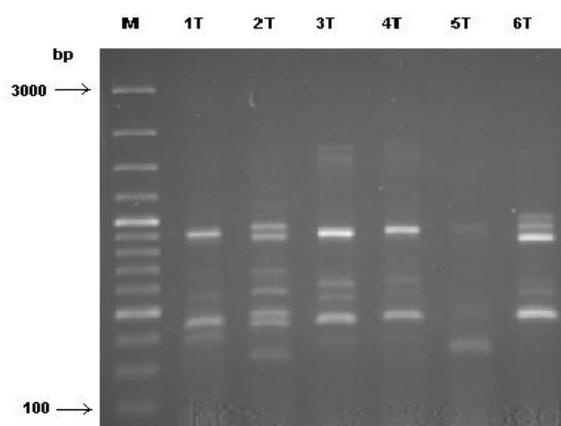


Figura 10 – Gel de agarose mostrando os produtos de PCR pelo método REP para os isolados do grupo de trigo. M (marcador de peso molecular), T (amostras de trigo).

O dendograma gerado a partir dos dados de similaridade de Jaccard (Figura 11A) para os isolados do trigo, apresentou um grupo com 100% de similaridade para os isolados 1T, 4T e 6T, quando analisado pelo método BOX – PCR. Sendo que o isolado 2T não apresentou similaridade quando comparado aos outros isolados. Uma explicação para esta diferença seria o fato deste isolado ter sido reclassificado como *B. thuringiensis*, membro do grupo cereus.

Quando analisado os dados obtidos pelo método de REP – PCR, pode-se verificar que três grupos foram formados por duplas, porém todos os isolados apresentaram baixa similaridade genética. Os isolados 3T e 5T foram os que apresentaram maior similaridade entre si, 37%. Os isolados 2T e 6T com 28% de similaridade entre si, seguido de 25% de similaridade entre os isolados 1T e 4T (Figura 11B). Um estudo realizado por Peruca *et. al* (2008) avaliaram um total de 117 amostras, 60 *B. thuringiensis* e 57 de *B. cereus*, utilizando REP-PCR para avaliação da diversidade genética. Os resultados mostraram baixa variabilidade quando comparados os *B. thuringiensis* identificando apenas 4 tipos eletroforéticos entre os 60 isolados. Quando avaliado as cepas de *B. cereus* mostraram alta variabilidade genética com diferentes padrões de bandas, levando a formação de vários grupos.

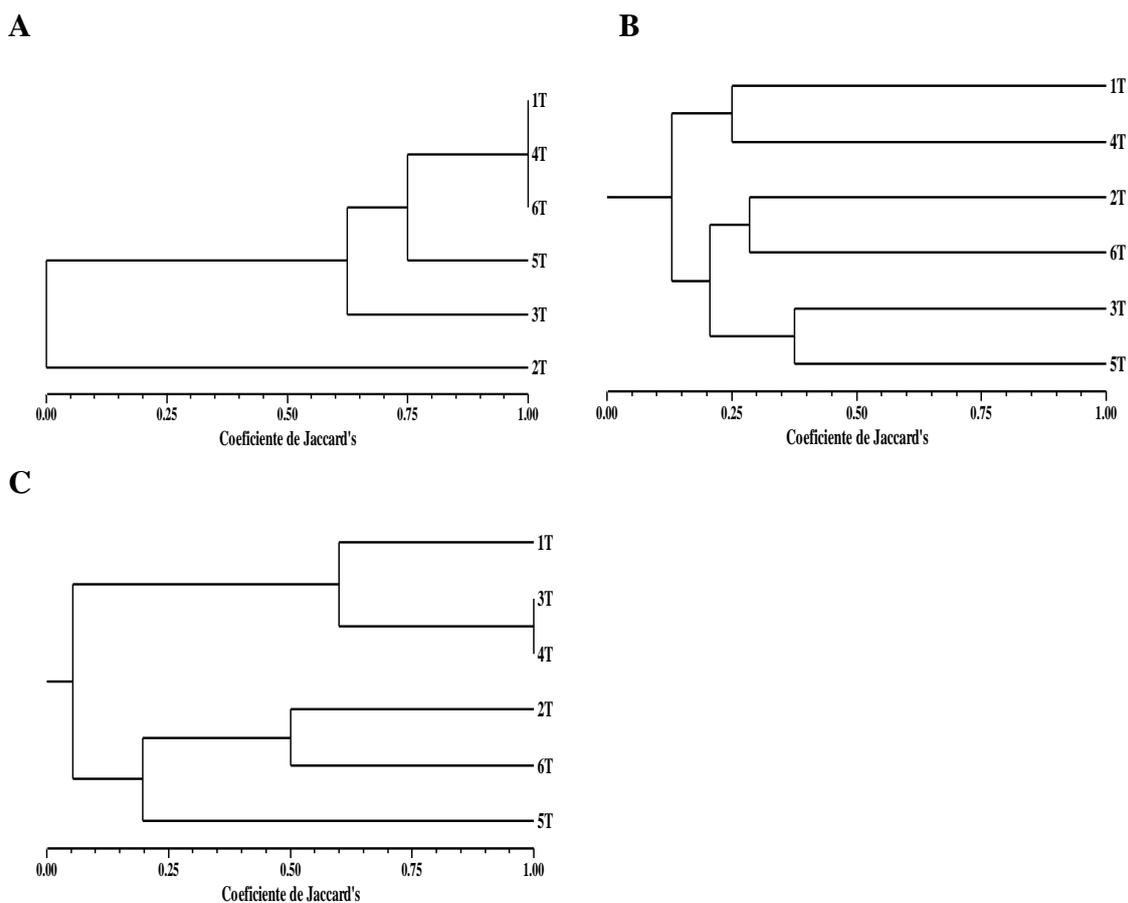


Figura 11 - Dendrograma de comparação de grau de similaridade a partir da análise de dados do BOX, REP e ERIC – PCR para as amostras do grupo de trigo. A) BOX – PCR.; B) REP – PCR; C) ERIC - PCR

O dendrograma gerado através da análise de dados do método ERIC – PCR apresentou a formação de dois grupos com duas duplas cada, um grupo formado pelos isolados 3T e 4T representando 100% de similaridade entre si e o grupo constituído pelos isolados 2T e 6T com 50% de similaridade entre si (Figura 11C). Analisando pelo ERIC – PCR, pode-se verificar que os isolados 2T e 6T apresentaram uma similaridade maior entre si (50%) quando comparado ao REP – PCR (28%).

Os produtos do BOX-PCR para os isolados do milho estão representados na Figura 12. Pode-se observar a formação de diversas bandas, sendo que as bandas das amostras 1M e 3M apresentaram maior intensidade.

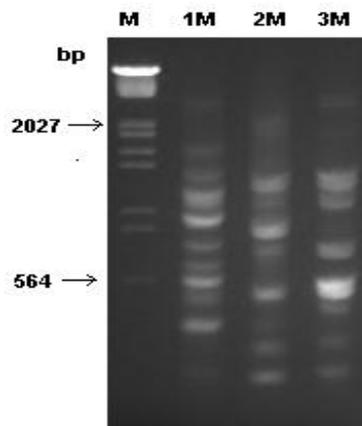


Figura 12 - Gel de agarose mostrando os produtos de PCR para o método BOX para os isolados do grupo de milho. M (marcador de peso molecular), 1M (amostras de milho).

O dendograma gerado a partir dos dados de similaridade de Jaccard (Figura 13A) representa a formação de um grupo constituído pelos isolados 2M e 3M, apresentando 50% de similaridade entre si, conforme observado na Figura 12, seguido de um subgrupo constituído por 1M com baixa similaridade, 10%. Quando analisado pelo método de REP – PCR (Figura 13B) os isolados apresentaram baixa similaridade, sendo 1M e 3M com 12% de similaridade entre si, seguido pelo isolado 2M com 8%. A Figura 13C mostra que todos os isolados apresentaram baixa similaridade quando avaliado pelo método de ERIC – PCR. Sendo que os isolados 2M e 3M com 8% de similaridade entre si e um subgrupo formado pelo isolado 1M que não apresentou similaridade quando comparado aos outros isolados.

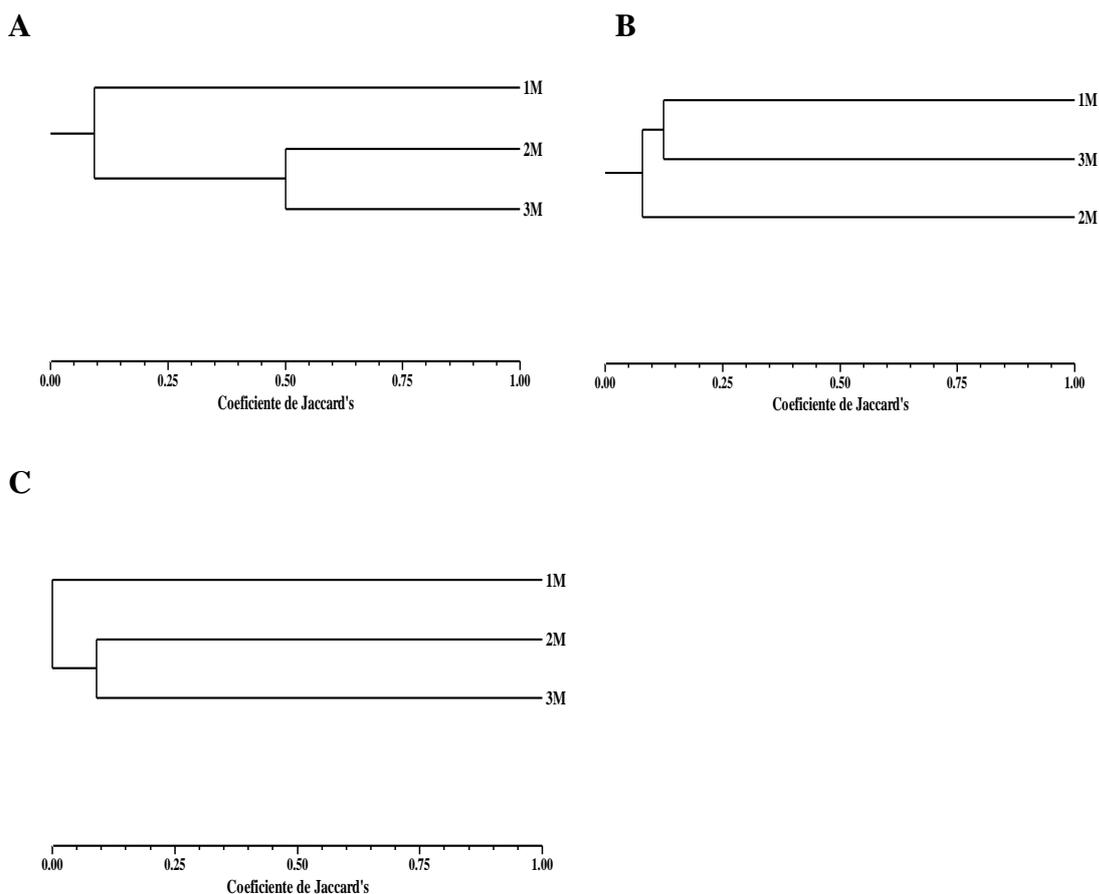


Figura 13 - Dendrograma de comparação de grau de similaridade a partir da análise de dados do BOX, REP e ERIC – PCR para as amostras do grupo de milho. A) BOX – PCR; B) REP – PCR; C) ERIC – PCR

Os dados obtidos neste estudo mostraram que os três métodos revelaram uma alta diversidade genética entre as estirpes de *B. cereus*, sendo que estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos por Park *et al.* (2009), onde mostraram que esta diversidade pode ser observada independentemente da técnica utilizada. Um estudo relatado por Vivoni *et al.* (2006) mostra que as estirpes isoladas a partir do mesmo tipo de alimentos ou com o mesmo perfil toxigênico apresenta distintos padrões, diferentemente do que ocorrem em espécies de *Staphylococcus aureus*, onde os genes das toxinas não estão relacionados com antecedentes genéticos.

Os produtos de PCR do grupo da cevada utilizando o método BOX – PCR estão representados na Figura 14.

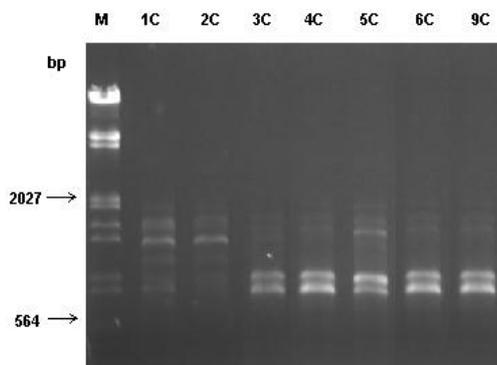
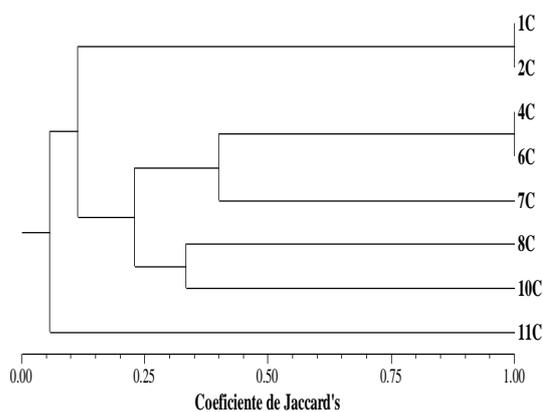


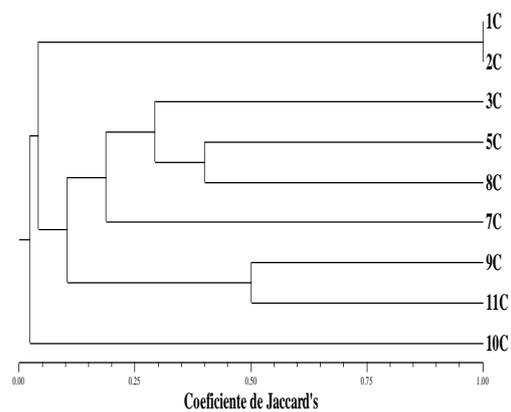
Figura 14 - Gel de agarose mostrando os produtos de PCR para o método BOX para os isolados do grupo de cevada. M (marcador de peso molecular), C (amostras de cevada).

Quando analisados os resultados obtidos pelo método BOX – PCR, para os isolados do grupo da cevada, observa-se que os isolados 1C e 2C; e 4C e 6C (*B. thuringiensis*) apresentaram 100% de similaridade entre si conforme pode ser observado nas Figuras 14 e 15A. Os isolados 3C, 5C e 9C não foram considerados pelo software para a formação do dendograma.

A



B



C

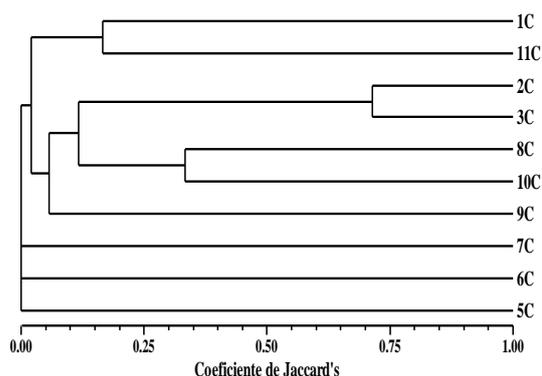


Figura 15 - Dendograma de comparação de grau de similaridade a partir da análise de dados do BOX, REP e ERIC – PCR para as amostras do grupo de cevada. A) BOX – PCR; B) REP – PCR; C) ERIC – PCR

Analisando os resultados obtidos por REP – PCR pode-se observar que os isolados 1C e 2C apresentaram 100% de similaridade entre si, seguido pelos isolados 9C e 11C com 50% de similaridade e 5C e 8C com 40% de similaridade entre si. O isolado 10C foi o que apresentou a menor similaridade quando comparado aos outros, 3% (Figura 15B). A amplificação de DNA de isolados de *B. cereus* por REP-PCR também foram avaliados por Chaves *et al.* (2011), onde os resultados indicaram um alto grau de diversidade genética entre as estirpes, o que pode ser relacionado com nosso trabalho que também apresentou alta diversidade entre os isolados. Os isolados 4C e 6C não foram considerados pelo software para a formação do dendograma.

O dendograma gerado para os resultados obtidos por ERIC – PCR formou três grupos com duas duplas (Figura 15C). Os isolados 2C e 3C apresentaram 72% de similaridade entre si, enquanto que os isolados 8C e 10C com 33% de similaridade entre si. O terceiro grupo apresentou baixa similaridade, representada por 15% para 1C e 11C.

A Figura 16 representa os produtos do PCR dos isolados do arroz utilizando a técnica ERIC – PCR.

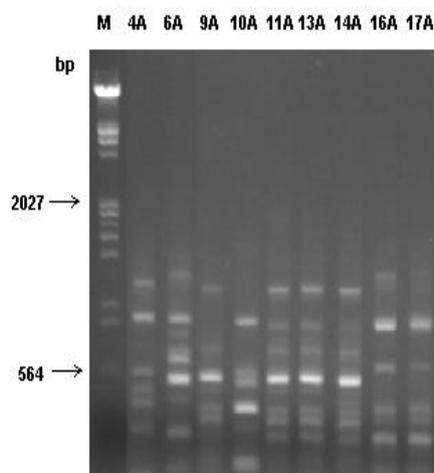


Figura 16 - Gel de agarose mostrando os produtos de PCR para o método ERIC para os isolados do grupo de arroz. M (marcador de peso molecular), A (amostras de arroz).

Nos resultados obtidos pelo método BOX – PCR, quando analisados para o grupo do arroz, observa-se que 1A, 2A e 3A; 5A, 6A e 7A; 8A e 19A; 9A, 11A e 12A; 13A e 14A; 15A e 16A apresentaram 100% de similaridade. Os isolados 17A e 18A apresentaram 50% de similaridade entre si. Os isolados 8A e 19A são 100% similares, sendo que 8A pertence ao *B. thuringiensis*. O isolado 4A também foi classificado como *B. thuringiensis*, porém, este não apresentou nenhuma similaridade quando avaliado para BOX – PCR (Figura 17A).

Analisando os dados obtidos a partir de REP – PCR (Figura 17B), pode-se afirmar que os isolados 6A e 7A; 12A e 13A; 17A e 18A foram 100% similares. Neste caso, os isolados 6A e 7A, apresentaram o mesmo grau de similaridade tanto para BOX - PCR quanto para REP – PCR. Os isolados 9A e 14A apresentaram 68% de similaridade entre si, já estes isolados quando avaliados pelo método anterior (Figura 17A) apresentaram uma menor similaridade, 50%. Para 1A e 8A (*B. thuringiensis*) foram obtidos 32% de similaridade, sendo que o outro membro classificado como *B. thuringiensis*, 4A, apresentou uma similaridade ainda menor, 22%. Isso justifica o fato de que apesar de ambos (*B. cereus* e *B. thuringiensis*) serem membros do mesmo grupo (*B. cereus*) apresenta uma diversidade genética entre si.

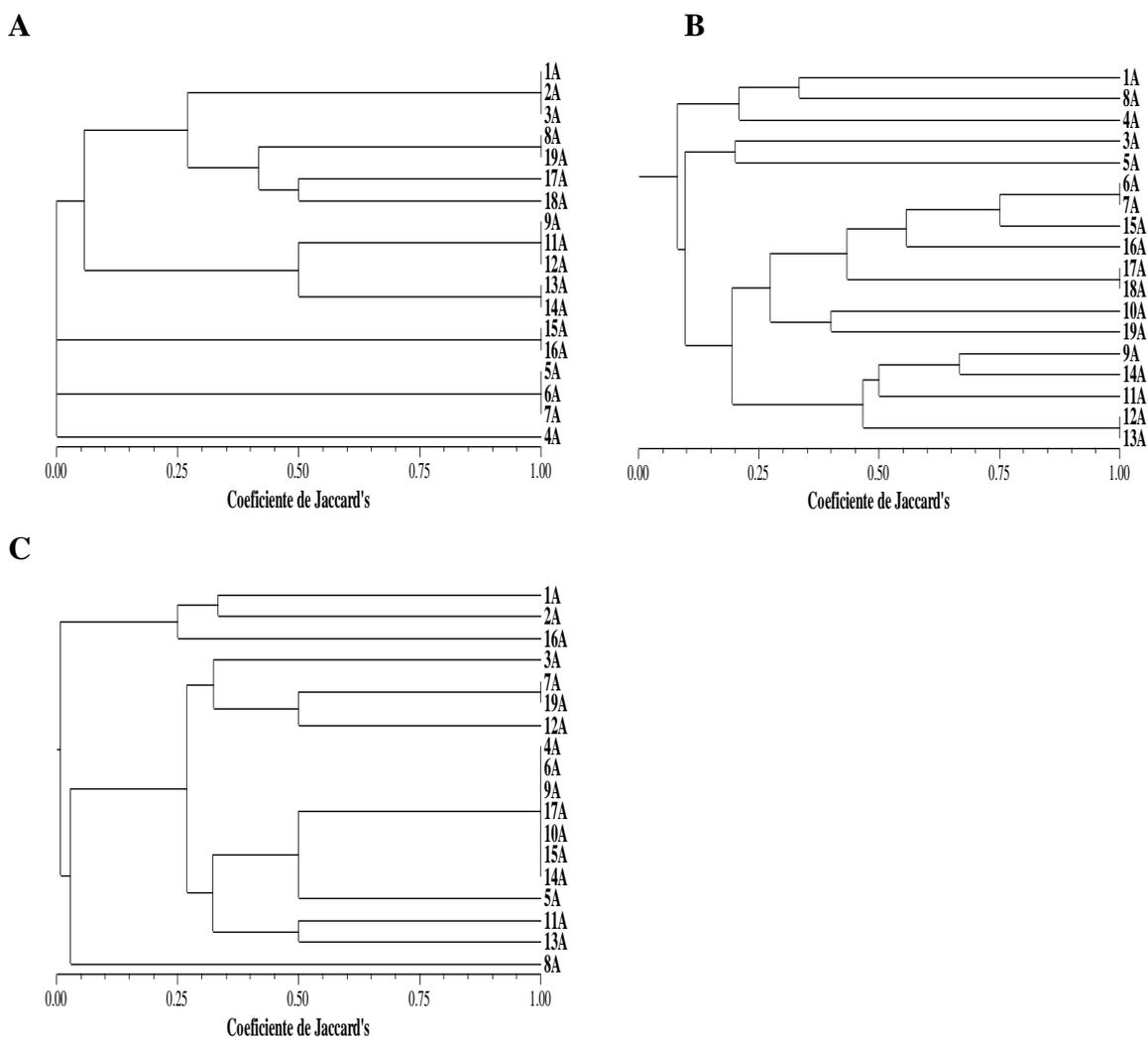


Figura 17 - Dendrograma de comparação de grau de similaridade a partir da análise de dados do BOX, REP e ERIC – PCR para as amostras do grupo de arroz. A) BOX – PCR; B) REP – PCR; C) ERIC – PCR

Analisando os dados obtidos por ERIC – PCR, pode-se verificar que um grande grupo foi formado com 100% de similaridade entre os isolados 4A, 6A, 9A, 10A, 14A, 15A e 17A, conforme pode ser observado na Figura 16. Os isolados 7A e 19A também apresentaram 100% de similaridade entre si e para 11A e 13A foram obtidos 50% de similaridade. Já o isolado 8A (*B. thuringiensis*) apresentou uma baixa similaridade, 3% quando comparado aos outros isolados (Figura 17C).

Shangkuan *et al.* (2000) investigaram a relação genética de 21 amostras de *B. anthracis* e 28 de *B. cereus*. Os resultados mostraram que em todos menos um caso, *B. anthracis* podem ser distinguidos de *B. cereus* utilizando diversos métodos inclusive por ERIC – PCR. Este método também foi utilizado para caracterizar diferentes bactérias Gram – negativas (Rodriguez – Barradas *et al.*, 1995; Shangkuan *et al.*, 1997).

A Figura 18 representa os produtos de PCR para a técnica REP-PCR para as amostras de feijão. O dendograma gerado a partir dos dados para o grupo do feijão, por BOX – PCR pode ser visualizado na Figura 19A, onde os isolados 7F, 8F, 9F, 10F e 11F, possuem 100% de similaridade entre si. Seguido pelo 3F e 4F que possuem 75% de similaridade entre si; 2F e 6F com 65%; 14F e 15F com 50% entre si. Os isolados 5F e 12F são pertencentes ao *B. megaterium*, sendo que estes apresentaram baixa similaridade quando comparado aos isolados de *B. cereus stricto sensu*, que pode ser explicado pelo fato de pertencerem a grupos distintos, por isso apresentaram esta diversidade genética.

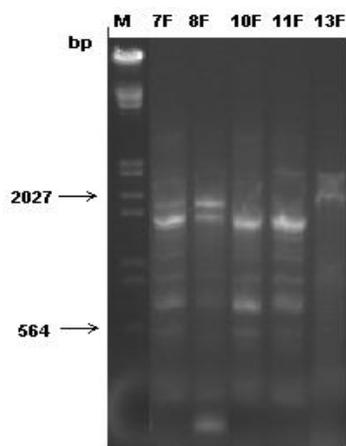


Figura 18 - Gel de agarose mostrando os produtos de PCR para o método REP para os isolados do grupo de feijão. M (marcador de peso molecular), F (amostras de feijão).

De acordo com o REP – PCR (Figura 19B), os dados obtidos representaram 100% de similaridade para os isolados 8F, 10F e 11F e 7F e 13F. Os isolados 2F e 3F com 83%; 1F e 4F com 75% e 6F e 14F com 25%, conforme pode ser visualizado na Figura 18.

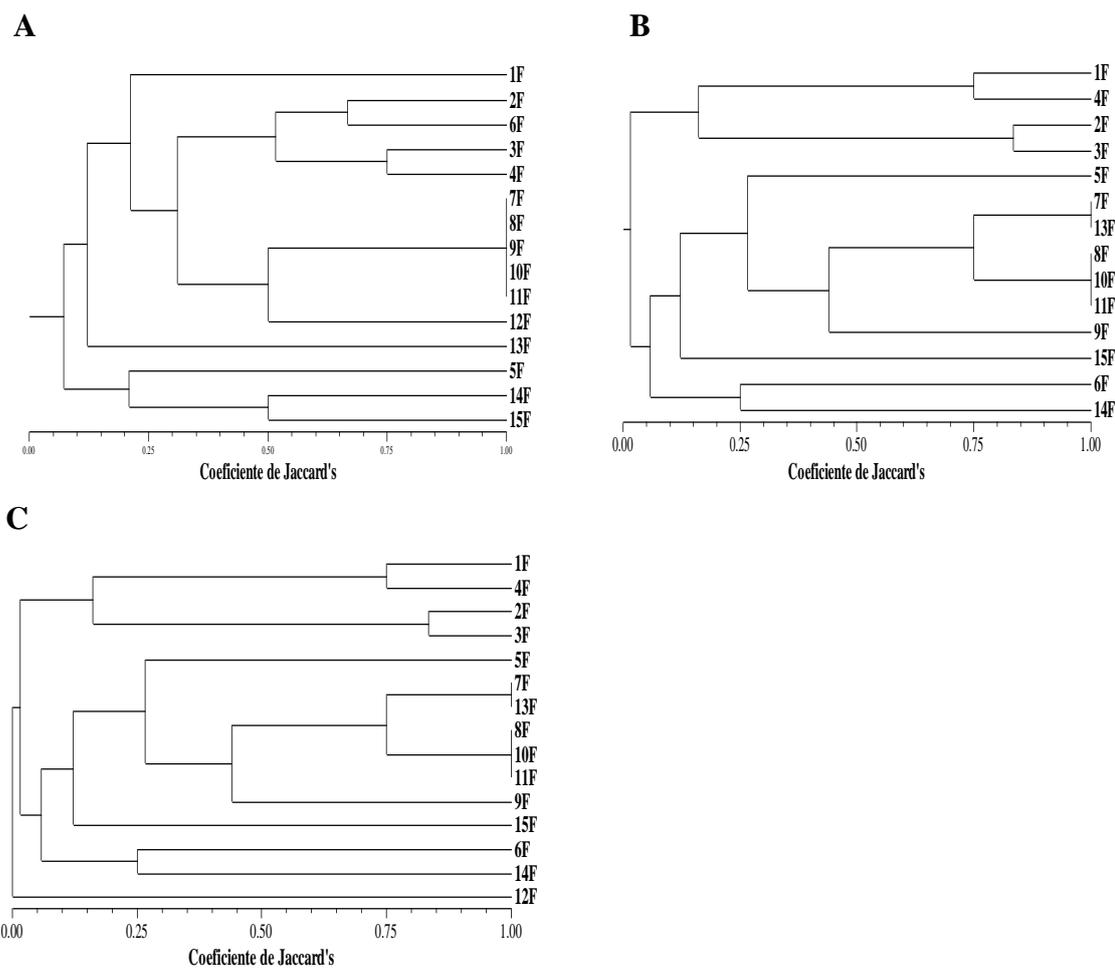


Figura 19 - Dendrograma de comparação de grau de similaridade a partir da análise de dados do BOX, REP e ERIC – PCR para as amostras do grupo de feijão. A) BOX – PCR; B) REP – PCR; C) ERIC – PCR

Os resultados obtidos pelo método ERIC – PCR mostram que os isolados 7F e 13F; 10F e 11F apresentaram 100% de similaridade. Os isolados 2F e 3F com 82%; 1F e 4F com 75%, sendo que os isolados pertencentes ao *B. thuringiensis* (5F e 12F) mostraram 28% para 5F e nenhuma similaridade para 12F (Figura 19C). Cherif *et al.* (2003), relata que têm sido utilizados REP e ERIC-PCR para bactérias dentro do gênero *Bacillus* (incluindo *B. thuringiensis*). Porém, os resultados encontrados não mostraram nenhuma similaridade significativa, o que indicou que REP ou ERIC podem ter apresentado resultados incertos, sugerindo que devem ser revistos.

Os resultados obtidos neste estudo permitiram evidenciar que quando utilizado quaisquer uma das técnicas moleculares, REP – PCR, BOX – PCR ou ERIC – PCR, nenhuma destas apresentou diferença significativa, visto que em todas as técnicas obteve-se uma alta diversidade genética. A análise molecular quando relacionada com a identificação bioquímica das amostras, observou-se que alguns isolados foram reclassificados como *B. thuringiensis* e *B. megaterium*, por apresentarem algumas características diferenciadas do *B. cereus stricto sensu*, embora possuam também características similares o que dificulta a separação desses microrganismos geneticamente, conforme pode ser observado na formação dos dendogramas.

5. CONCLUSÕES

Os dados obtidos neste trabalho possibilitam concluir que:

- A prevalência de *B. cereus latu sensu* em amostras de cereais da região sul do Brasil é elevada (41,5%), correspondente as 54 que apresentaram positividade para *B. cereus*, visto sendo que deste total, 7 isolados foram reclassificados como pertencentes ao grupo *cereus*, *B. thuringiensis* e *B. megaterium*.

- Dentre os isolados que apresentaram maiores números de unidades formadoras de colônias, está o grupo do arroz, variando de 2×10^2 a 4×10^3 UFC/g, sendo que alguns dos isolados deste grupo apresentaram resultados acima do limite permitido pela legislação, o que torna o alimento inseguro ou impróprio para consumo.

- De acordo com o elevado número de isolados positivos para *B. cereus*, observou-se uma relação com o período de armazenamento, onde os cereais obtiveram os maiores números de positividade para o microrganismo, visto que a partir do 4 mês de armazenamento observou-se crescimento do microrganismo no feijão, sendo este relacionado a forma de armazenamento (sacos) quando comparado aos outros cereais armazenados a granel (silos) com controle de umidade e temperatura.

- Dentre os métodos moleculares avaliados, nenhum dos métodos utilizados apresentaram uma diferença significativa, visto que para os três métodos obteve-se uma alta diversidade genética.

- Na avaliação dos fatores de patogenicidade, os genes *HblA* e *NheB*, foram os que apresentaram positividade num maior número de isolados.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abee, T.; Groot, M.N.; Tempelaars, M.; Zwietering, M.; Moezelaar, R.; Voort, M.V.D. (2011). Germination and outgrowth of spores of *Bacillus cereus* group members: diversity and role of germinant receptors. **Food Microbiol.** 28:199-208.

Abriouel, H.; Omar, N.B.; Lopez, R.L.; Canamero, M.M.; Ortega, E.; Galvez, A. (2007). Differentiation and characterization by molecular techniques of *Bacillus cereus* group isolates from poto poto and dégué, two traditional cereal-based fermented foods of Burkina Faso and Republic of Congo. **J. Food Prot.** 70: 1165-1173.

Ágata, N.; Ohta, M.; Arakawa, Y.; Mori, M. (1995). The *bceT* gene of *Bacillus cereus* encodes an enterotoxin protein. **Microbiology** 141: 983-988.

Andersson, M.A.; Jaaskelainen, E.L.; Shaheen, R.; Pirhonen, T.; Wijnands, L.M.; Salkinoja-Salonen, S.M. (2004). Sperm bioassay for rapid detection of cereulide-producing *Bacillus cereus* in food and related environments. **Int J Food Microb.** 94: 175– 183.

Arnesen, L.P.S.; Fagerlund, A. Granum, P.E. (2008). From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. **Microbiol Rev.** 32: 579-606.

Asano, S. I.; Nukumizu, Y.; Bando, H.; Hzuka, T.; Yamamoto, T. (1997). Cloning of enterotoxin genes from *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. **Appl. Environ. Microbiol.** 63: 1054-1057.

Ash, C.; Farrow, J.A.; Dorsch, M.; Stackebrandt, E.; Collins, M.D. (1991). Comparative analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus* and related species on the basis of reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. **Int. J. System. Bacteriol.** 41: 343 - 346.

Bartoszewicz, M.; Hansen, B.M.; Swiecicka, I. (2008). The members of the *Bacillus cereus* group are commonly present contaminants of fresh and heat-treated milk. **Food Microb.** 25: 588–596.

Beecher, D.J.; Wong, A.C.L. (2000). Cooperative, synergistic and antagonistic haemolytic interactions between haemolysin BL, phosphatidylcholine phospholipase C and sphingomyelinase from *Bacillus cereus*. **Microbiol.** 146: 3033–3039.

Bennet, R.W.; Belay, N. (2001). *Bacillus cereus*. In: DOWNS, F.P.; ITO, K. (Eds.). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4^a Ed. American Public Health Association, Washington DC, EUA, p.311-316.

Bhunja, A. K. (2007). *Bacillus cereus* and *Bacillus anthracis*. In A. K. Bhunja (Eds.) **Foodborne Microbial Pathogens: Mechanisms and Pathogenesis**; (1^o Edição), (276).

Boer, E.; Beumer, R.R. (1999). Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms. **Int. J. Food Microbiol.** 50: 119-130.

Bollet, C; Gevaudan, M. J.; Lamballerie, X.; Zandotti, C.; Micco, P. (1991). A simple method for the isolation of chromosomal DNA from Gram positive or acid-fast bacteria. **Nucleid Acids Res.** 19: 1739 – 1740.

Boonchai N.; Asano S. Bando, H.; Wiwat, C. (2008). Study on Cytotoxicity and Nucleotide sequences of enterotoxin FM of *Bacillus cereus* isolated from various food Sources. **J Med Assoc Thai.** 91: 1425 – 1432.

Brasil (2001). Resolução RDC nº 12 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2 jan. 2001.

Carlin, F.; Fricker, M.; Pielaat, A.; Heisterkamp, S.; Shaheen, R.; Salonen, M. S.; Svensson, B.; Nguyen-Thé, C.; Ehling-Shulz, M. (2006). Emetic toxin-producing strains of *Bacillus cereus* show distinct characteristics within the *Bacillus cereus* group. **Int J Food Microb.** 109: 132-138.

Carlin, F.; Brillard, J.; Broussole, V.; Clavel, T.; Duport, C.; Jobin, M.; Guinebretière, M.H.; Auger, S.; Sorokine, A.; Nguyen-The, C. (2010). Adaptation of *Bacillus cereus*, an ubiquitous worldwide-distributed foodborne pathogen, to a changing environment. **Food Res Int.** 43: 1885-1894.

Carlson, C.R.; Johansen T.; Kolsto, A.B. (1996). The chromosome map of *Bacillus thuringiensis* subsp. *canadensis* HD 224 is highly similar to that of the *Bacillus cereus* type strain ATCC 14579. **FEMS Microbiol Lett.** 141: 163-167.

Chaves, J.Q; Pires, E.S; Vivoni, A.M. (2011). Genetic diversity, antimicrobial resistance and toxigenic profiles of *Bacillus cereus* isolated from food in Brazil over three decades. **Int J Food Microb.**147: 12-16.

Cherif, A.; Ettoumi, B.; Raddadi, N.; Daffonchio, D.; Boudabous, A. (2007). Genomic diversity and relationship of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* by multi-REP PCR fingerprinting. **Can J Microb** 53: 343–350.

Choma, C; Granum, P.E. (2002). The enterotoxin T (BcET) from *Bacillus cereus* can probably not contribute to food poisoning. **FEMS Microb Lett.** 217: 115-119.

Cousin, M.A. (1982). Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: a review. **J Food Protect** 45: 172-207.

Damgaard, P. H.; Jacobson, C. S.; Sorensen, J. (1996). Development and application of a primer set for specific detection of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* in soil using

magnetic capture hybridization and PCR amplification. **Syst. Appl. Microbiol.** 19: 436 - 441.

Destro, M.T. (1995). *Listeria monocytogenes* em camarão (*Penaeus brasiliensis*): marcadores sorológicos e genéticos no monitoramento de sua disseminação em uma unidade processadora de pescado. **Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos)**– Universidade de São Paulo, São Paulo.

Dietrich, R.; Moravek, M.; Burk, C.; Granum, P.E.; Märklbauer, E. (2005). Production and characterization of antibodies against each of the three subunits of the *Bacillus cereus* nonhaemolytic enterotoxin complex. **Appl Environ Microbiol.** 71:8214 - 8220.

Drobniewski, F.A. (1993). *Bacillus cereus* and related species, **Clin. Microbiology. Rev.** 6: 324 -338.

Dufrenne, J.; Bijwaard, M.; Giffel, M.; Beumer, R.; Notermans, S. (1995). Characteristics of some psychrotrophic *Bacillus cereus* isolates. **Int J Food Microb.** 27:175-183.

Ehling-Schulz, M.; Fricker, M.; Scherer, S. (2004 a). *Bacillus cereus*, the causative agent of an emetic type of foodborne illness. **Mol Nutr Food Res.** 48: 479-487.

Ehling-Schulz, M.; Fricker, M.; Scherer, S. (2004 b). Identification of emetic toxin producing *Bacillus cereus* strains by a novel molecular assay. **FEMS Microb Lett.** 232:189-195.

Ehling-Schulz, M.; Fricker, M.; Grallert, H.; Rieck, P.; Wagner, M.; Scherer, S. (2006). Cerulide synthetase gene cluster from emetic *Bacillus cereus*: Structure and location on a mega virulence plasmid related to *Bacillus anthracis* toxin plasmid pX01. **BMC Microbiol.** 6: 20.

Farber, J.M.; Gendel S.M.; Tyler K.D.; Boerlin P.; Landry W.L.; Fritschel S.J. and Barrett T.J. (2001). **Molecular typing and differentiation**. Washington D.C. Apha, cap. 11, p. 127-158.

Foegeding, P.M.; Berry, E.D. (1997). Cold temperature growth of clinical and food isolated of *Bacillus cereus*. **J Food Protect.** 60: 1256 - 1258.

Forsythe, S. J. (2002). **Microbiologia da segurança alimentar**. Trad. Maria Carolina Minardi Guimarães e Cristina Leonhardt – Porto Alegre: Artmed, 2002, p 216, 211.

Francis, K.P.; Mayr, R.; Stetten, F.; Stewart, G.S.A.B.; Scherer, S. (1998). Discrimination of psychrotrophic and mesophilic strains of the *Bacillus cereus* group by PCR targeting of major cold shock protein genes. **Appl Environ Microb.** 64: 3525-3529.

Fricker, M.; Messelhäuber, U.; Busch, U.; Scherer, S.; Ehling-Schulz, M. (2007). Diagnostic real-time PCR assays for the detection of emetic *Bacillus cereus* strains in foods and recent food-borne outbreaks. **Appl Environ Microbiol** 73: 1892–1898.

Fritze, D. (2004). Taxonomy of the Genus *Bacillus* and related genera: the aerobic endospore-forming bacteria. **Phytopathology** 94: 1245- 1248.

García-Armesto, M.R.; Sutherland, A.D. (1997). Temperature characterization of psychrotrophic and mesophilic *Bacillus* species from milk. **J Dairy Res.** 64: 261-270.

Gillings, M.; Holley, M. (1997). Repetitive element PCR fingerprinting (rep-PCR) using enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) primers is not necessarily directed at ERIC elements. **Lett Appl Microbiol.** 25: 17-21.

Gore, H.M.; Spira, W.M.; Kim, H.U. (2003). Real-time molecular beacon NASBA reveals hblc expression from *Bacillus spp.* in milk. **Biochem Bioph Res Com.** 311: 386-390.

Granum, P.E.; Lund, T. (1997). *Bacillus cereus* its food poisoning toxins. **FEMS Microbiol Lett.** 157, 223-228.

Granun, P.E.; O'sullivan, K.; Lund, T. (1999). The sequence of the non-hemolytic enterotoxin operon from *Bacillus cereus*. **FEMS Microbiol Lett.** 177: 225-229.

Guinebretière, M.H.; Thompson, F.L.; Sorokin, A.; Normand, P.; Dawyndt, P.; Ehling-Schulz, M.; Svensson, B.; Sanchis, V., 68 Nguyen-The, C.; Heyndrickx, M.; De Vos, P. (2008). Ecological diversification in the *Bacillus cereus* group. **Appl Environ Microbiol.** 10: 851-865.

Hansen, B. M.; Hendriksen, N. B. (2001). Detection of enterotoxin *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis. **Appl Environ Microbiol.** 67: 185-189.

Helgason, E., Caugant, D.A., Lecadet, M.M., Chen, Y., Mahillon, J., Lovgren, A., Hegna, I., Kvaloy, K. (1998) Genetic diversity of *Bacillus cereus*/*B. thuringiensis* isolates from natural sources. **Curr Microbiol** 37: 80–87.

Helgason, E., Caugant, D.A., Olsen, I. and Kolsto, A.B. (2000a) Genetic structure of population of *Bacillus cereus* and *B. thuringiensis* isolates associated with periodontitis and other human infections. **J Clin Microbiol** 38: 1615–1622.

Hendriksen, N.B; Hansen, B.M; Johansen, J.E. (2006). Occurrence and pathogenic potential of *Bacillus cereus* group bacteria in a sandy loam. **Anton Leeuw.** 89: 239 –249.

Henrichs, H.; Douglas, J.; Beecher, D. J.; Macmillan, J.D.; Zilinskas, B.A. (1993). Molecular cloning and characterization of the hblA gene encoding the B component of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. **J Bacteriol.** 175: 6760 – 6766.

Hergenrother, P.J.; Martin, S.F. (1997). Determination of the kinetic parameters for phospholipase C (*Bacillus cereus*) on different phospholipids substrates using a chromogenic assay based on the quantitation of inorganic phosphate. **Anal Biochem.** 251: 45–49.

Hsieh, Y.M.; Sheu, S.J.; Chen, Y.L.; Tsen, H.Y. (1999). Enterotoxigenic profiles and polymerase chain reaction detection of *Bacillus cereus* group cells and *B. cereus* strains from food-borne outbreaks. **J Appl Microbiol** 87: 481-490.

Ikezawa, H.; Taguchi, R. (1981). Phosphatidylinositol-specific phospholipase C from *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. **Method Enzymol.** 71: 731–741.

Jaasklainen, E. (2008). Assessment and control of *Bacillus cereus* emetic toxin in food. **Department of Applied Chemistry and Microbiology – Division Microbiology.** Helsinki, University of Helsinki, Finland, PhD thesis: 74.

Jay, J.M. (2000). *Bacillus cereus* gastroenteritis. In J.M. Jay, (Eds.). **Modern Food Microbiology.** (6ª edição). Gaithersburg (MD): Aspen. p 679.

Kramer, J. M., Gilbert, R. J. (1989). *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. In M. P. Doyle (ed.), **Foodborne bacterial pathogens.** (Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.23), p 796.

Kotiranta, A.; Lounatmaa, K.; Haapasalo, M. (2000). Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. **Microbes Infect.** 2: 189 – 198.

Larsen, H.D.; Jorgensen, K. (1997). The occurrence of *Bacillus cereus* in Danish pasteurized milk. **Int J Food Microbiol.** 34: 179–186.

Lechner, S.; Mayr, R.; Francis, K.P.; Prub, B.M.; Kaplan, T.; Wiebnergunkel, E.; Stewart, G.S.A.B.; Scerer, S. (1998). *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. **Int J Syst Bacteriol.** 48: 1373-1382.

Lindback, T; Granum, P.E. (2006). Detection and Purification of *Bacillus cereus* Enterotoxins. In: Methods in Biotechnology. **Food-Borne Pathogens: Methods and Protocols**, p 15 – 26.

Lund T., De Buyser M.L., Granum, P.E. (2000). A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. **Mol Microbiol.** 38: 254 –261.

Mahler, H; Pasi, A; Kramer, J.M; Schulte, P; Scoging, A.C; Bär, W; Krähenbul, S. (1997). Fulminant liver failure in association with the emetic toxin of *Bacillus cereus*. **N Engl J Med.** 336:1142-1148.

Malorny, B.; Tassions, P.T.; Radström, P.; Cook, N.; Wagner, M.; Hoorfar, J. (2003). Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. **Int J Food Microbiol.** 83: 39-48.

Manzano, M., Giusto, C., Iacumin, L., Cantoni, C., Comi, G., (2009). Molecular methods to evaluate biodiversity in *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains from different origins. **Food Microbiol.** 26: 259–264.

Martínez-Blanch, J.F; Sánchez, G.; Aznar, R. (2009). Development of a real-time PCR assay for detection and quantification of enterotoxigenic members of *Bacillus cereus* group in food samples. **Int J Food Microbiol,** 135: 15-21.

Matarante, A.; Baruzzi, F.; Cocconcelli, S.; Morea, M. (2004). Genotyping and Toxigenic Potential of *Bacillus subtilis* and *Bacillus pumilus* Strains Occurring in Industrial and Artisanal Cured Sausages. **Appl Environ Microbiol.** 70: 5168–5176.

Mayr, B.; Kaplan, T.; Lechner, S.; Scherer, S. (1996). Identification and purification of a family of dimeric major cold shock protein homologs from the psychrotrophic *Bacillus cereus* WSBC 10201. **J Bacteriol**, 178: 2916- 2925.

Molva, C; Sudagidan, M; Okuklu, B. (2009). Extracellular enzyme production and enterotoxigenic gene profiles of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains isolated from cheese in Turkey. **Food Control**. 20: 829–834.

Oda, M., Takahashi, M., Matsuno, T., Uoo, K., Nagahama, M., Sakurai, J., 2010. Hemolysis induced by *Bacillus cereus* sphingomyelinase. **Biochimica et Biophysica Acta** 1798: 1073–1080.

Park, Y.B., Kim, J.B., Shin, S.W., Kim, J.C., Cho, S.H., Lee, B.K., Ahn, J., Kim, J.M., Oh, D.H. (2009). Prevalence, genetic diversity, and antibiotic susceptibility of *Bacillus cereus* strains isolated from rice and cereals collected in Korea. **J Food Prot**. 72, 612–617.

Peruca, A. P.; Vilas-Bôas, G.; Arantes, O. (2008). Genetic relationships between sympatric populations of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*, as revealed by rep-PCR genomic fingerprinting. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 103: 497-500.

Pomerantsev, A.P., K.V. Kalnin, M. Osorio & S.H. Leppa (2003). Phosphatidylcholine-Specific Phospholipase C and Sphingomyelinase Activities in Bacteria of the *Bacillus cereus* Group. **Infec Immun**. 71: 6591–6606.

Rajkowski, K. T.; Bennett, R. W. (2003). *Bacillus cereus*. In M. D. Miliotis & J. W. Bier (Eds) **Intentional Handbook of Foodborn Pathogens**, (1^o Edição). (688).

Rasko, D. A.; Ravel, J.; Okstad, O. A.; Helgason, E.; Cer, R. Z.; Jiang, L.; Shores, K. A.; Fouts, D. E.; Tourasse, N. J.; Angiuoli, S. V.; Kolonay, J.; Nelson, W. C.; Kolsto, A.-B.;

Fraser, C. M.; Read, T. D. (2004). The genome sequence of *Bacillus cereus* ATCC 10987 reveals metabolic adaptations and a large plasmid related to *Bacillus anthracis* pXO1. **Nucleic Acids**. 32: 977-988.

Robinson, R. K.; Phill, M. A. D. (1987). **Microbiologia lactológica**. Zaragoza: Acribia, p 18-32.

Rhodehamel, E.J.; Harmon, S.M. (1998). *Bacillus cereus*. In: Hammack, T.; Feng, P.; Jinneman, K.; Regan, P.M.; Kase, J.; Orlandi, P.; Burkhardt, W. (Eds.). Bacteriological Analytical Manual. 8^a Ed. **FDA**, cap.14.

Rodriguez-Barradas, M.C., Hamill, R.J., Houston, E.D. (1995) Genomic fingerprinting of *Bartonella* species by repetitive element PCR for distinguishing species and isolates. **J Clin Microbiol**, 33: 1089 - 1093.

Ruiz - Arguello, M.B., F.M. Goni & A. Alonso (1998). Phospholipase C hydrolysis of phospholipids in bilayers of mixed lipid compositions. **Biochemistry**, 37: 11621–11628.

Senesi, S.; Ghelardi, E. (2010). Production, secretion and biological activity of *Bacillus cereus* enterotoxins. **Toxins**, 2: 1690-1703.

Shaheen, R.; Andersson, M.; Apetroaie, C.; Schulz, A.; Ehling-Schulz, M.; O. Ollilainen, V.; Salkinoja-Salonen, M. (2006). Potential of selected infant food formulas for production of *Bacillus cereus* emetic toxin, cereulide. **Int J Food Microbiol**. 107: 287-294.

Shangkuan, Y.H., Tsao, C.M. And Lin, H.C. (1997) Comparison of *Vibrio cholerae* O1 isolates by polymerase chain reaction fingerprinting and ribotyping. **J Med Microbiol**. 46: 941 - 948.

Shangkuan, Y.H., Lin, H.C. And Wang, T.M. (1997) Diversity of DNA sequences among *Vibrio cholerae* O1 and non-O1 detected by whole-cell repetitive element sequence-based polymerase chain reaction. **J Appl Microbiol.** 82: 335-344.

Silva, N.; Junqueira, V.C.A.; Silveira, N.F.A.; Tniwaki, M.H.; Santos, R.F.S.; Gomes, R.A.R. (2010). **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água.** Editora Livraria Varela, São Paulo, Brasil, p 624.

Stenfors, L.P; Granum, P.E. (2001). Psychrotolerant species from the *Bacillus cereus* group are not necessarily *Bacillus weihenstephanensis*. **FEMS Microbiol Lett**, 197: 223-228.

Stetten, F.; Mayr, R.; Scherer, S. (1999). Climatic influence on mesophilic *Bacillus cereus* and psychrotolerant *Bacillus weihenstephanensis* populations in tropical, temperate and alpine soil. **Environ Microbiol**, 1: 503-515.

Vaisanen, O.M.; Mwaishumo, N.J.; Salkinoja-Salonen, M.S. (1991). Differentiation of dairy strains of the *Bacillus cereus* group by phage typing, minimum growth temperature and fatty acid analysis. **J Appl Microbiol**, 70: 315-324.

Vasconcelos, C.F. (2006). Análise microbiológica de barras de cereais matinais, comercializados na cidade de Pelotas – RS. **Monografia de conclusão de curso.** Universidade Federal de Pelotas. Pelotas – RS, Brasil.

Varnam, A. H.; Evans, M.G. (1991). *Bacillus*. In: **Foodborne Pathogens**. London: Mosby Year Book, p, 267-288.

Versalovic J., Koeuth T., Lupski R.J. (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Res.** 9: 6823 – 31.

Versalovic J., Scheneider M., De Breijin F.J., Lupskin, J.R. (1994). Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence – based polymerase chain reaction. **Methods Mol. Cell Biol.** 5: 25 – 40.

Vilas-Bôas, G.T.; Peruca, A.P.S.; Arantes, O.M.N. (2007). Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis* and *Bacillus thurigiensis*. **Can. J. Microbiol.** 53: 673 – 687.

Vivoni, A.M., Diep, B.A., De Gouveia Magalhaes, A.C., Santos, K.R., Riley, L.W., Sensabaugh, G.F., Moreira, B.M. (2006). Clonal composition of *Staphylococcus aureus* isolates at a Brazilian university hospital: identification of international circulating lineages. **J Clin Microbiol.** 44, 1686–1691.

Wijnands, L.M; Dufrenne, J.B; Van Leusden, F.M. (2002). Characterization of *Bacillus cereus*. **National Institute for Public Health and the Environment (RIVM).**

Zhou, G.; Zheng, D.; Dou, L.; Cai, Q.; Yuan, Z. (2010). Occurrence of psychrotolerant *Bacillus cereus* group strains in ice creams. **Int J Food Microbiol**, 137: 143-146.