



## COMPARAÇÃO DE DOIS MÉTODOS DE ANÁLISES PARA *Bacillus cereus* EM ALIMENTOS

Aline Brenelli **Martins**<sup>1</sup>; Maristela Silva **Nascimento**<sup>2</sup>; Margarete Midori **Okazaki**<sup>2</sup>; Neliane Ferraz de Arruda **Silveira**<sup>3</sup>

Nº 14224

**RESUMO** - Foram avaliados dois meios de cultura para isolamento de *Bacillus cereus* em produtos alimentícios: MYP (Mannitol yolk polymixin) e Bacara (novo meio cromogenico da Bio Merieux <sup>TM</sup>). Vinte e uma amostras de alimentos (refeições prontas para o consumo, concentrado protéico de soja, sobremesa “petit gateau”, leite com amendoim em pó e preparado lácteo) e 10 amostras de “swab” de instalações de indústrias alimentícias, foram analisadas para esse fim. No total foram isoladas 331 colônias para identificação, e entre estas, 156 foram colônias morfológicamente características e 37 não características para *B. cereus*, provenientes do meio tradicional MYP e; 119 colônias morfológicamente características e 19 não características, provenientes do meio alternativo Bacara (Bio-Mérieux) Após a obtenção dos resultados, os testes bioquímicos complementares confirmaram que no meio tradicional MYP as cepas morfológicamente características indicaram índices de 91% de resultados positivos e 9% de resultados negativos, enquanto cepas morfológicamente não características apresentaram índices de 5% de positividade, 95% de resultados negativos. No meio de cultivo Bacara as cepas morfológicamente características mostraram índices de 87% de positividade e 13% de resultados negativos, enquanto cepas morfológicamente não características apresentaram índices de 14% de positividade, 86% de resultados negativos.

**Palavras-chaves:** *Bacillus cereus*, meios de cultura para *Bacillus cereus*, *Bacillus cereus* em alimentos, comparação de métodos microbiológicos.meio de Ágar Manitol Gema de Ovo Polimixina, meio de cultura Bacara.

1 Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Biomedicina, Veris Metrocamp IBTA, Campinas-SP alinebrenelli@bol.com.br

2 Colaborador, Instituto de Tecnologia de Alimentos, ITAL, Campinas/SP

3 Orientador: Pesquisador do Instituto de Tecnologia de Alimentos, ITAL, Campinas-SP neliane@ital.sp.gov.br



**8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014  
12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo**

**ABSTRACT** Two culture media for the isolation of *Bacillus cereus* in food products were evaluated: MYP (Mannitol yolk polymyxin) and Bacara (Bio Merieux chromogenic medium TM) Twenty one samples of food (ready to eat meals, soy protein concentrate, sweet "petit gateau "peanut milk powder and milk prepared) and 10 samples of swab from food industry facilities, were analyzed for this purpose. In total 331 colonies were isolated for identification. From this total, and 156 morphological characteristics of *B. cereus* and 37 non morphological characteristics were obtained from the traditional medium MYP; and 119 morphologically characteristics colonies and 19 non morphologically characteristics colonies were isolated from alternative medium Bacara (Bio-Mérieux) . After obtaining the results, the biochemical confirmations tests, indicated that characteristics strains from traditional colonies, in medium MYP, indicated rates of 91% of positive results and 9% of negative results, while strains of no morphological characteristics showed indices of 5% positive, 95% negative.

In strains morphologically characteristics, from Bacara medium, the positive rates were 87% and 13% for negative results, while strains morphologically non characteristic from this medium , the results showed indices of 14% positive ,and 86% of negative results.

**Keywords:** *Bacillus cereus*, culture media for *Bacillus cereus*, *Bacillus cereus* in foods, comparison of microbiological methods, Mannitol yolk polymyxin medium, Bacara medium.

O grupo da bactéria patogênica, *Bacillus cereus* é composto pelas espécies *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. Weihenstephanensis*, *B. mycoides*, *B. pseudo-mycoides* e *B. anthracis*. A diferenciação do *B. cereus* entre os outros microrganismos pertencentes ao mesmo grupo é possível com a realização de testes para confirmação de natureza bioquímica.

*Bacillus cereus* é uma bactéria gram positiva, da família *Bacillaceae* e tem como ambiente natural o solo, sendo amplamente distribuída na natureza. Apresenta-se em forma de bastonete, formadora de esporos, móvel e aeróbica facultativa. Desenvolve-se na faixa de temperatura de 4 a 55°C ,com crescimento ótimo entre 30 e 40°C. O pH ótimo para seu desenvolvimento, está entre os valores de 6.0 e 7.0, com mínimo de 5.0 e máximo de 8.8 .A atividade de água mínima para seu desenvolvimento é de 0,93 (SILVA et al, 2010). Seus esporos conferem resistência a altas temperaturas e a vasta gama de enzimas que degradam diversos tipos de substratos orgânicos possibilita a contaminação de diferentes tipos de alimentos, (LANDGRAF & FRANCO,1996)



## 8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014 12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

particularmente os ricos em amido ou proteínas (BENNETT e BELAY, 2001). Normalmente é encontrado em baixos níveis nos alimentos ( $<10^2$  UFC/g), os quais, quando se refere a saúde pública são considerados aceitáveis.(BRASIL, 2001). Os alimentos mais envolvidos em intoxicações alimentares por *B. cereus* são produtos cozidos ou com ingredientes cozidos, especialmente os ricos em amidos ou proteínas como arroz, massas, vegetais, sopas, saladas de vegetais, brotos de sementes, pudins, carnes. O cozimento ativa os esporos e senão houver refrigeração adequada, os esporos podem germinar e produzir novas células e suas toxinas.(SILVA et al, 2010) De acordo com KRAMER & GILBERT, (1989), os surtos de intoxicação incriminando essa bactéria estão associados às falhas na conservação dos produtos como exposição a temperaturas inadequadas, possibilitando que este microrganismo se multiplique até a população igual ou maior a  $10^5$  UFC/g com a produção de toxinas , causando as síndromes conhecidas como síndrome emética e síndrome diarréica. A síndrome diarréica é caracterizada por dores abdominais, diarreia e náuseas que podem durar de 12 à 24h (GRANUM et al, 1994). Essa toxina é termossensível, desativada por aquecimento a  $56^{\circ}\text{C}/5$  minutos (SILVA et al, 2010) Já a síndrome emética se assemelha muito com aquela causada por *Staphylococcus aureus*, prevalecendo os vômitos (MARINO, 2006).. A toxina emética é um pequeno peptídeo altamente resistente ao calor, que pode suportar o cozimento, ate tratamentos termicos mais severos como  $126^{\circ}\text{C} /90$  minutos, ou  $120^{\circ}\text{C}/1$  hora. (SILVA et al, 2010)

Essas síndromes, segundo alguns autores, não são consideradas graves, porém as complicações advindas destas podem gerar infecções sistêmicas, abscessos pulmonares, endocardite e morte na infância. (LUND et al.,2000) O tratamento comum se dá através de reposição hidro-eletrolítica em casos mais graves.

De acordo com a literatura científica, o microrganismo *B. cereus* é considerado o segundo maior causador de surtos por toxinas bacterianas em alimentos na Europa.No Brasil, e mais especificamente na cidade de Campinas, estado de São Paulo, um trabalho investigativo realizado por pesquisadores na Universidade Estadual de Campinas, obteve-se que essa bactéria foi responsável por 78,6% dos surtos relacionados com serviços de alimentação no período de 1987 a 1993 (AZEREDO et al, 2002). Muitos outros casos isolados tem ocorrido.Portanto, é de grande valia que estudos que envolvam a comparação de métodos para sua detecção mais rápida em alimentos sejam realizados, especialmente em nosso país onde a documentação de ocorrência de surtos de doenças transmitidas por alimentos é bastante escassa. Muitos meios de cultura tem sido lançados no mercado para identificação de patógenos em alimentos, tentando buscar uma resposta mais rápida e/ou precisa.No presente estudo foi realizada uma comparação com isolados



## 8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014 12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

de alimentos dos meios MYP, (Mannitol yolk polymixin) tradicional na análise para *Bacillus cereus* em alimentos e o meio cromogenico Bacara (Bio-Mérieux), composto de peptonas , antibióticos contra microbiota indesejada, e fosfolipideos específicos.

Assim sendo, o objetivo do presente estudo foi avaliar e comparar a eficácia dos meios de cultura – MYP, tradicional, e o alternativo Bacara (Bio Mérieux) para isolamento e identificação de *Bacillus cereus* em amostras de alimentos naturalmente contaminadas.

## 2.MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Amostragem

Para a comparação dos meios de cultivo em estudo, foram avaliadas cepas isoladas a partir de alimentos naturalmente contaminados. Foram analisadas 21 amostras de alimentos (refeições prontas para o consumo, concentrado proteico de soja, 'petit gateau' , leite com amendoim em pó e preparado lácteo) e 10 amostras de " swab" de instalações industriais totalizando 31 amostras.

### 2.2 Teste Presuntivo

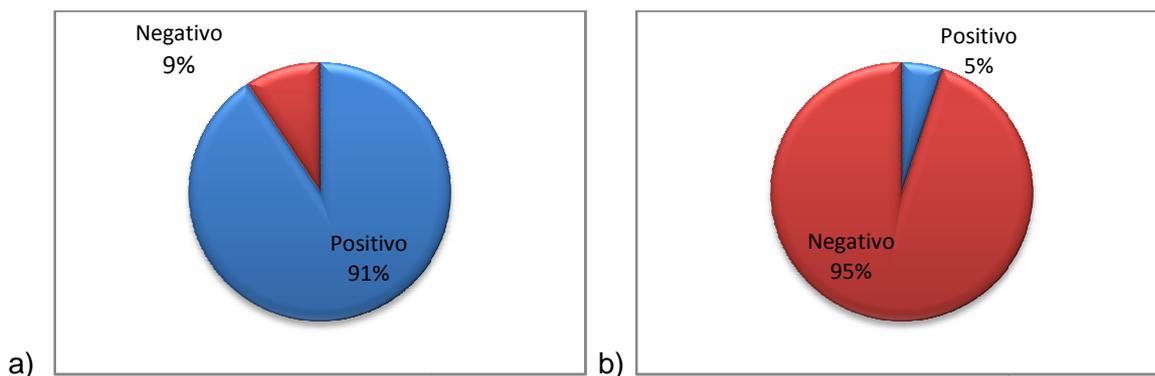
Para o teste presuntivo foram homogeneizados 25g de amostra e 225ml de água peptonada e realizadas diluições decimais seriadas. Em seguida, foi realizado o plaqueamento em superfície em Mannitol yolk polymixin ou Ágar Manitol Gema de Ovo Polimixina (MYP) e no meio Bacara, ambos com incubação a 30°C por 24 horas. As colônias típicas foram isoladas em Ágar Nutriente (NA) para posterior identificação através de testes bioquímicos (BENNETT e BELAY, 2001; SILVA et al, 2010).

### 2.3. Testes adicionais para confirmação

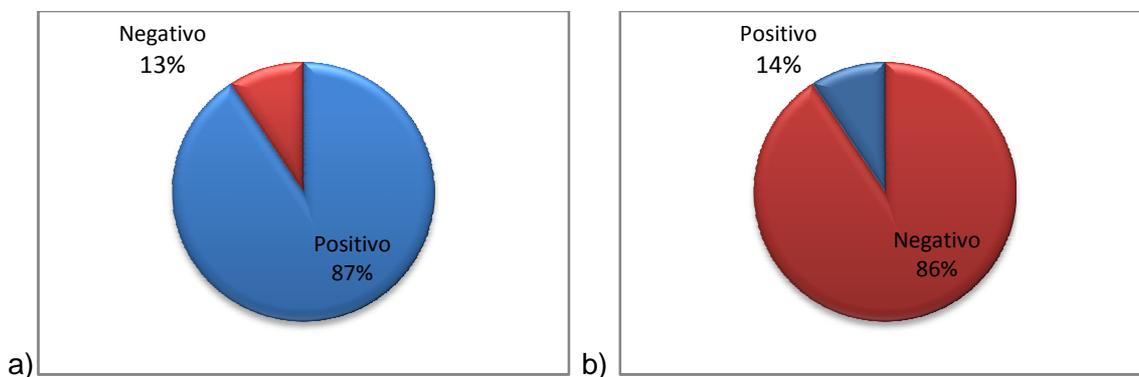
Para a confirmação e identificação dos isolados foram realizados os seguintes testes confirmatórios (APHA): utilização anaeróbia da glicose, decomposição da tirosina, teste de Voges-Proskauer, redução do nitrato, teste de motilidade, crescimento rizóide, presença de cristais de toxinas intracelulares e atividade hemolítica, descritos em SILVA et al, 2010. Colônias típicas no meio de cultivo MYP são de coloração rósea leitosa com halo ao redor pela não fermentação do manitol. Colônias típicas em meio de cultivo Bacara são de coloração róseo alaranjadas, com halo de precipitação ao redor.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram isoladas no total, 331 colônias, sendo 156 morfologicamente características e 37 morfologicamente não características provenientes do meio de cultivo tradicional MYP e 119 morfologicamente características e 19 morfologicamente não características provenientes do meio de cultivo Bacara (Tabelas 1 e 2). Para confirmação, foram realizados testes complementares. Após a obtenção dos resultados, as cepas morfologicamente características indicaram índices de 91% de positividade e 9% de resultados negativos, enquanto cepas morfologicamente não características apresentaram índices de 5% de positividade, 95% de resultados negativos em MYP (Figura 1). No meio de cultura Bacara as cepas morfologicamente características indicaram índices de 87% de positividade e 13% de resultados negativos, enquanto cepas morfologicamente não características apresentaram índices de 14% de positividade, 86% de resultados negativos (Figura 2).



**FIGURA 1.** Total de colônias positivas e negativas pela metodologia da APHA, 2001 oriundas do meio de cultivo MYP:(a):colônias morfologicamente características (b): colônias morfologicamente não características



**FIGURA 2.** Total de colônias positivas e negativas pela metodologia da APHA, 2001 oriundas do meio de cultivo Bacara: (a) colônias morfologicamente características; (b) colônias morfologicamente não características .



**TABELA 1.** Número (%) de positividade do grupo do *Bacillus cereus* em amostras de alimentos pelo método clássico utilizando o meio de cultivo MYP.

MYP							
Amostra	Nº de amostras	Tipo de colônia		Confirmação Bioquímica			
		Típica	Atípica	Positivo		Negativo	
				Típica	Atípica	Típica	Atípica
Alimentos prontos para o consumo (arroz, feijão e guarnição)	11	33	26	88%	7%	12%	93%
Swab de instalações	10	93	1	91%	-	9%	100%
Preparado lácteo	5	8	6	87%	-	13%	100%
Concentrado proteico de soja	2	3	2	100%	20%	-	80%
Probiótico	1	4	-	83%	-	17%	-
Sobremesa “Petit Gateau”	1	10	-	100%	-	-	-
Leite com amendoim em pó	1	5	2	71%	-	29%	100%
Total	31	156	37	91%	5%	9%	95%



**TABELA 2.** Número (%) de positividade do *Bacillus cereus* em amostras de alimentos pelo método clássico utilizando o meio de cultivo Bacara.

<b>Bacara</b>							
Amostra	Nº de amostras	Tipo de colônia		Confirmação Bioquímica			
		Típica	Atípica	Positivo		Negativo	
				Típica	Atípica	Típica	Atípica
Alimentos prontos para o consumo (arroz, feijão e guarnição)	11	19	11	81%	31%	19%	69%
Swab de instalações	10	77	-	87%	-	13%	-
Preparado lácteo	5	6	5	75%	40%	25%	60%
Concentrado proteico de soja	2	10	-	100%	-	-	-
Probiótico	1	-	3	-	33%	-	67%
Sobremesa “Petit Gateau”	1	6	-	100%	-	-	-
Leite com amendoim em pó	1	1	-	100%	-	-	-
<b>Total</b>	<b>31</b>	<b>119</b>	<b>19</b>	<b>87%</b>	<b>13%</b>	<b>14%</b>	<b>86%</b>

Esses resultados evidenciam o risco de se adotar a prática laboratorial de não confirmar com testes adicionais as colônias com características atípicas isoladas. Algumas cepas de *B. cereus* podem não apresentar algumas das características fundamentais e se desenvolverem como atípicas, porém apresentando toxicidade, sendo danosas à saúde.

#### **4.CONCLUSÃO**

Os resultados obtidos durante a execução do presente trabalho levam a concluir que ambos os meios se mostraram eficientes na detecção de colônias típicas de *Bacillus cereus* em alimentos, entretanto, as provas adicionais foram essenciais para que se confirme a detecção do *Bacillus*



## 8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014 12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

*cereus* a nível de espécie nessas matrizes. O meio Bacara mostrou um nível um pouco mais elevado de isolados positivos atípicos, após confirmação. Uma continuidade nos estudos entre esses dois meios de cultivo é recomendável, principalmente aumentando a diversidade de amostras, inclusive analisando produtos típicos de outros países, para que se obtenha resultados mais conclusivos advindos de um universo amostral maior.

### 5. AGRADECIMENTO

Agradecemos ao CNPq pela bolsa concedida .

### 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZEREDO, R.M.C.; PASSOS, F.J.V.; KUAYE, A.Y. Cinética do crescimento de *Bacillus cereus* em meio de arroz, sob diferentes temperaturas. *Higiene Alimentar, S.Paulo*, v.16, nº100, p.111-115, 2002.

BENNETT, R.W.; BELAY, N. *Bacillus cereus*. In: DOWNES, F.P., and K. ITO (ed.), Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, *American Public Health Association*, Washington, D.C., chap.32, 4 ed., p.311-316, 2001.

BRASIL, Ministério da Saúde. RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. *Diário oficial da união*, Brasília, 2001

GRANUM, P.E.; BAIRD-PARKER, T. *Bacillus* species. In: LUND, B.M.; BAIRD-PARKER, C.; GOULD, G.W. The microbiological safety and quality of food. Gaithersburg, Maryland: *Aspen Publishers*, v.II, chap.39, p.1029-1039, 2000.

KRAMER, J.M.; GILBERT, R.J. *Bacillus cereus* and other *bacillus* species. In: Doyle MP, editor. *Foodborne bacterial pathogens*. New York: Marcel Dekker, p. 21-70, 1989.

LANDGRAF, M.; FRANCO, B.D.G.M; Doenças microbianas de origem alimentar provocadas por enteropatógenos. *Revista de Ciências farmacêuticas*. (Araraquara), S.Paulo, v.17, p.77.113, 1996.

LUND, T.; DE BUYSER, M.L.; GRANUM, P.E. A new enterotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. *Molecular Microbiology*, v.38, p.254–261, 2000.

MARINO, M. Tossinfezioni alimentari da *Bacillus cereus*. *Igieni Alimenti – Desinfestazione & Igiene Ambientale*, Marzo/Aprile, 2006.

LUND BM. Foodborne disease due to *Bacillus* and *Clostridium* species. *Lancet*, v. 336, p. 982-986, 1990.

SILVA, N. et al. Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água, *Editores Varela*, 4 ed., São Paulo, p.165-176, 2010.