

Contaminação ambiental e perfil toxigênico de *Bacillus cereus* isolados em serviços de alimentação

Environmental contamination and enterotoxigenic profile of *Bacillus cereus* isolated in food services

Celina Mara Soares^{I*} Geórgio Friesz Valadares^{II} Raquel Monteiro Cordeiro de Azeredo^{III}
Arnaldo Yoshiteru Kuaye^{IV}

RESUMO

A avaliação da contaminação ambiental por *Bacillus cereus* foi realizada em 90 amostras de ar ambiente e em 96 amostras de superfícies de bancadas e de equipamentos, de dois restaurantes institucionais. O microrganismo foi detectado em 84,4% e 44,8% das amostras de ar ambiente e de superfícies, respectivamente. O potencial enterotoxigênico dos isolados foi investigado através da reação da polimerase em cadeia (PCR) para os genes *hblA*, *hblD* e *hblC* (que codificam a hemolisina BL) e para os genes *nheA*, *nheB* e *nheC* (que codificam a enterotoxina não hemolítica - NHE). De um total de 70 isolados investigados, 14,3% foram positivos para os três genes da HBL e 12,8% foram positivos para os três genes da NHE. A produção de NHE também foi verificada através do Bacillus Diarrhoeal Enterotoxin Visual Immunoassay (kit BDE-VIA; Tecra). Os resultados obtidos com o kit revelaram que 61,4% dos 70 isolados são produtores de NHE.

Palavras-chave: segurança alimentar, hemolisina, enterotoxina diarréica, PCR, ELISA.

ABSTRACT

Ninety air samples and ninety six samples from benches and equipments surfaces were collected in two food services for investigation of *Bacillus cereus* contamination sources and characterization of strains toxin profiles. *B. cereus* was detected in 84.4% and 44.8% from air samples and samples from benches and equipments surfaces, respectively. The potential of enterotoxin production was investigated using polymerase chain reaction (PCR) methods for genes *hblA*, *hblD* e *hblC* (encoding hemolysin BL) and for genes *nheA*, *nheB* and *nheC* (encoding non-hemolytic enterotoxin - NHE). From 70 isolates investigated 14.3% were positive for the three HBL encoding genes and 12.8% were positive for the three

NHE encoding genes. The Bacillus Diarrhoeal Enterotoxin Visual Immunoassay (BDE-VIA; Tecra) also was used for NHE detection. The results obtained with BDE-VIA revealed that 61.4% from the 70 strains are NHE producers.

Key words: safe food, hemolysin, diarrhoeal enterotoxin, PCR, ELISA.

INTRODUÇÃO

Bacillus cereus é um microrganismo Gram positivo amplamente distribuído na natureza, sendo o solo seu reservatório natural. A presença da bactéria ou de seus esporos em alimentos é relativamente freqüente. Devido a algumas propriedades dos esporos - como a sobrevivência em diferentes temperaturas e valores de pH, resistência à desidratação e irradiação e capacidade de adesão às superfícies que contatam alimentos - a indústria de alimentos encontra dificuldades para eliminar o microrganismo do ambiente industrial (ANDERSSON et al., 1995; KOTIRANTA et al., 2000). *B. cereus* é isolado a partir de produtos crus e processados, como arroz, condimentos, vegetais, preparações cárneas e laticínios. Esse microrganismo está associado a duas doenças transmitidas por alimentos, denominadas de “síndrome emética” e “síndrome diarréica” (KRAMER & GILBERT, 1989).

A síndrome diarréica é caracterizada por dor abdominal, diarréia e náuseas que se estendem por 12

^IPrograma de Pós-graduação, Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Campinas, SP, Brasil. E-mail: celinamsoares@yahoo.com.br. *Autor para correspondência.

^{II}Programa de Pós-graduação, Instituto de Biologia, UNICAMP. Campinas. SP. Brasil.

^{III}Departamento de Nutrição e Saúde, Universidade Federal de Viçosa (UFV). Viçosa, MG, Brasil.

^{IV}Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA), FEA, UNICAMP. Campinas, SP, Brasil.

a 24h (GRANUM, 1994). Essa doença está associada a várias enterotoxinas, dentre elas, a enterotoxina hemolisina BL (HBL) e a enterotoxina não-hemolítica (NHE). Essas enterotoxinas foram estudadas e caracterizadas por alguns pesquisadores (BEECHER & MACMILLAN, 1991; HEINRICHS et al., 1993; LUND & GRANUM, 1996; RYAN et al., 1997; GRANUM et al., 1999). O complexo HBL é formado por três componentes denominados B, L₁ e L₂ (pesos moleculares de 35, 36 e 45kDa, respectivamente) (BEECHER & MACMILLAN, 1991) e requer os três componentes para intensificar ao máximo as atividades hemolítica, citotóxica e dermonecrótica, além da ação de permeabilidade vascular e de acúmulo de fluido em alças intestinais de coelho (BEECHER et al., 1995). O gene do componente B da HBL, denominado de *hblA*, foi seqüenciado por HEINRICHS et al. (1993). Os genes responsáveis pelas frações L₁ e L₂, foram seqüenciados por RYAN et al. (1997) e denominados respectivamente por *hblD* e *hblC*. O complexo NHE é composto por três proteínas de peso molecular igual a 39, 45 e 105kDa e também requer todos os componentes para a sua máxima toxicidade em testes com células Vero (african green monkey kidney) e Caco-2 (*human intestinal epithelial cells*) (LUND & GRANUM, 1996). Os genes que codificam as três proteínas que compõem a NHE foram seqüenciados por GRANUM et al. (1999) e denominados *nheA*, *nheB* e *nheC*.

No presente estudo, avaliou-se a contaminação ambiental por *B. cereus* em serviços de alimentação através de análises microbiológicas. O perfil toxigênico dos isolados foi investigado utilizando-se as técnicas de ELISA e da reação da polimerase em cadeia (PCR), considerando-se os complexos HBL e NHE. A pesquisa foi realizada em dois restaurantes institucionais, através da análise de amostras do ar ambiente e de superfícies de bancadas e equipamentos.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras ambientais

As amostras ambientais foram coletadas em dois restaurantes institucionais: restaurante 1 (R1), que prepara cerca de 6 mil refeições diárias, e restaurante 2 (R2), onde são preparadas cerca de 2 mil refeições diárias. A coleta das amostras foi realizada conforme metodologia descrita por EVANCHO et al. (2001).

Amostras de ar ambiente (500 l) foram aspiradas por 5 min para placas de Petri contendo meio seletivo para *B. cereus* - ágar MYP (*Mannitol yeast polymixin agar*; Difco), suplementado com 0,1% de Sulfato de Polimixina B (Sigma). As coletas foram realizadas através do equipamento *Microbiological*

Air Sampler (MAS 100; Merck).

A amostragem das superfícies de bancadas e dos equipamentos foi realizada utilizando-se o “método de contato com esponja”, através de esponjas previamente umedecidas com solução de tampão fosfato (*Butterfield's phosphate-buffered dilution water*, pH 7,2) suplementado com polisorbato e tiosulfato de sódio a 0,5%. A área amostrada por bancada foi de 60x70cm e o resultado expresso em cm². Quanto aos equipamentos, as amostras foram coletadas das áreas que têm contato com os alimentos, sendo o resultado expresso como ausência ou presença de *B. cereus*. Após a amostragem, as esponjas foram “massageadas” por 15s com diluente (solução tampão fosfato, pH 7,2). Em seguida, foram realizadas inoculações (0,1ml) de cada uma das amostras, em placas contendo meio seletivo para *B. cereus* (ágar MYP).

Isolamento, confirmação e identificação de *Bacillus cereus*

A contagem, o isolamento, a confirmação e a identificação de *B. cereus* foram realizadas conforme metodologia recomendada por RHODEHAMEL & HARMON (1998). Uma cepa padrão (*B. cereus* ATCC 11145) foi utilizada como controle. Após as análises para a confirmação, foram realizados testes para a diferenciação de outros membros do grupo do *B. cereus* (*Bacillus anthracis*, *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus mycoides*).

As placas contendo ágar MYP, inoculadas com amostras ambientais, foram incubadas a 30°C/24h. Posteriormente, de cada placa contendo colônias típicas do microrganismo (colônias não fermentadoras de manitol e produtoras de lecitinase), foram isoladas entre três e cinco colônias típicas. Esses isolados suspeitos para *B. cereus* foram mantidos em ágar nutriente (*Nutrient agar*; Merck) a 4°C. Em seguida, eles foram confirmados e identificados através da coloração de Gram, da reação da catalase, da mentação anaeróbia da glicose, da redução de nitrato, do teste VP (*Voges-Proskauer*) modificado, da decomposição da tirosina, da resistência a lisozima, do teste de motilidade, do crescimento rizóide e da atividade hemolítica. A detecção de cristais de toxinas para a diferenciação da espécie *B. thuringiensis* foi realizada segundo metodologia descrita por SHARIF & ALAEDDINOGLU (1988).

Avaliação da produção de enterotoxinas através de ELISA e PCR

Culturas

Setenta isolados, provenientes de amostras de ar e de superfícies, com perfil clássico de *B. cereus*

nos testes bioquímicos de confirmação e de identificação da espécie, foram cultivados em caldo BHI (*Brain heart infusion broth*; Difco), suplementado com 0,1% de glicose, e incubados a 30°C/18h para a avaliação da produção de enterotoxinas. Uma cepa padrão (*B. cereus* ATCC 14579) foi utilizada como controle.

ELISA e PCR

A produção da enterotoxina não-hemolítica foi avaliada através de ELISA, utilizando-se o *Bacillus Diarrhoeal Enterotoxin Visual Immunoassay* (kit BDE, vs MS2207 05/01; Tecra, Roseville New South Wales, Austrália). Este ensaio detecta a proteína de 45kDa da NHE, codificada pelo gene *nheA*, e foi realizado conforme as instruções do fabricante.

A presença de genes que codificam os complexos HBL e NHE foi verificada através da técnica da PCR. Os iniciadores (*primers*) utilizados para a amplificação dos genes associados à produção das enterotoxinas estão listados na tabela 1. A extração e as condições de amplificação do DNA foram realizadas conforme metodologia adotada por HANSEN & HENDRIKSEN (2001). Para a extração, uma alçada da massa bacteriana crescida em meio sólido foi transferida para um tubo *Eppendorf*, onde foram adicionados 200µl de água Milli-Q esterilizada. As células bacterianas foram lisadas através da incubação a 102°C por 10min e os fragmentos foram removidos por centrifugação a 13.000 x g por 3min. O sobrenadante com o DNA bacteriano foi estocado a 4°C. A amplificação do DNA foi realizada em *Termociclador Mastercycler® gradient* (*Eppendorf*), utilizando-se 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 15s, anelamento a 55°C por 45s e extensão a 72°C por 2min. Para cada reação de amplificação, foi preparado um volume total de reação de 30µl, contendo

1µl da enzima Taq DNA polimerase (1U µl⁻¹); 3µl de tampão 10x (200mM Tris-HCl – pH 8,0; 500mM de KCl); 1µl de MgCl₂; 0,24µl de dNTPs 25mM; 1µl de cada um dos *primers*; 7µl do DNA extraído e água Milli-Q esterilizada (qsp 30µl). Os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose a 2%, através do sistema de eletroforese horizontal submersa (SAMBROOK et al., 1989). A identificação dos produtos amplificados foi efetuada com o auxílio de um marcador de peso molecular (100pb *ladder*, *Biotools*), utilizado em todos os géis de agarose analisados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Trezentas e trinta e uma colônias suspeitas, isoladas de amostras de ar ambiente e de superfícies, foram submetidas aos testes microbiológicos e bioquímicos de confirmação e identificação. Deste total, 76,1% foram identificados como *B. cereus*. Outras duas espécies do grupo do *B. cereus* também foram identificadas: *B. mycooides* (4,5%) e *B. thuringiensis* (3,6%). Tal como *B. cereus*, essas espécies foram identificadas em amostras de ar ambiente e de superfícies.

Os resultados obtidos através das análises microbiológicas revelaram a presença de *B. cereus* no ar ambiente de 84,4% do total das amostras coletadas em ambos os restaurantes (Tabelas 2 e 3). No R1, as contagens de *B. cereus* variaram entre 2,0 e 38,4UFC m⁻³ de ar (Tabela 2). Nesse estabelecimento, as áreas onde foram observados os maiores pontos de contaminação foram as áreas de cocção (38,4UFC m⁻³), distribuição (28,0UFC m⁻³) e *self-service* (27,6UFC m⁻³). No R2, as contagens de *B. cereus* em amostras de ar ambiente variaram entre 2,0 e 20,0UFC m⁻³ de ar (Tabela 3), sendo observado o maior valor na área recepção de gêneros (20,0UFC m⁻³).

Tabela 1 - Genes e *primers* utilizados na PCR para a caracterização enterotoxigênica de isolados de *Bacillus cereus* provenientes de amostras ambientais.

| Gene | <i>primer</i> | Seqüência (5'-3') | Posição do <i>primer</i> | Referência |
|-------------|--------------------|-----------------------|--------------------------|---|
| <i>hblA</i> | HBLA1 | GTGCAGATGTTGATGCCGAT | 671-690→ | HEINRICHS et al. (1993); HANSEN & HENDRIKSEN (2001) |
| | HBLA2 | ATGCCACTGCGTGGACATAT | 990-971← | |
| <i>hblD</i> | L1A | AATCAAGAGCTGTCACGAAT | 2854-2873→ | RYAN et al. (1997); HANSEN & HENDRIKSEN (2001) |
| | L1B | CACCAATTGACCATGCTAAT | 3283-3264← | |
| <i>hblC</i> | L2A | AATGGTCATCGGAACCTCTAT | 1448-1467→ | RYAN et al. (1997); HANSEN & HENDRIKSEN (2001) |
| | L2B | CTCGCTGTTCTGCTGTTAAT | 2197-2178← | |
| <i>nheA</i> | <i>nheA</i> 344 S | TACGCTAAGGAGGGGCA | 344-360→ | GRANUM et al. (1999); GHELARDI et al. (2002) |
| | <i>nheA</i> 843 A | GTTTTTATTGCTTCATCGGCT | 843-823← | |
| <i>nheB</i> | <i>nheB</i> 1500 S | CTATCAGCACTTATGGCAG | 1500-1518→ | GRANUM et al. (1999); GHELARDI et al. (2002) |
| | <i>nheB</i> 2269 A | ACTCCTAGCGGTGTTC | 2269-2253← | |
| <i>nheC</i> | <i>nheC</i> 2820 S | CGGTAGTGATTGCTGGG | 2820-2836→ | GRANUM et al. (1999); GHELARDI et al. (2002) |
| | <i>nheC</i> 3401 A | CAGCATTCTGACTTGCCAA | 3401-3383← | |

Tabela 2 - *Bacillus cereus* em amostras ambientais do restaurante institucional 1, segundo o tipo de amostra e local de coleta.

| Tipo de amostra e local de coleta | Número de amostras analisadas (n° positivas) | Contagem (UFC)* |
|--|--|---------------------------|
| Ar ambiente | | |
| Áreas de alimentos não-processados: pré-preparo de vegetais; pré-preparo de carnes; antecâmara; recepção de gêneros; almoçarifado. | 15 (12) | 2,0-16,0/m ³ |
| Áreas de alimentos processados: carnes preparadas; cocção. | 6 (6) | 2,0-38,4/m ³ |
| Áreas de alimentos prontos para o consumo: distribuição; <i>self-service</i> ; distribuição de marmitas; monta-cargas. | 12 (12) | 2,0-28,0/m ³ |
| Outros locais: manipulação de talheres. | 03 (2) | 8,0-24,0/m ³ |
| Superfícies de bancadas | | |
| Áreas de alimentos não-processados: pré-preparo de vegetais; pré-preparo de carnes. | 12 (6) | 0,07-0,72/cm ² |
| Áreas de alimentos processados: carnes preparadas; cocção. | 12 (6) | 0,07-2,20/cm ² |
| Superfícies de equipamentos | | |
| Que contatam alimentos não-processados: multiprocessador; triturador; descascador de legumes; cortador de legumes. | 9 (7) | NR |
| Que contatam alimentos processados: fatiadores. | 9 (6) | NR |

* Unidade Formadora de Colônia.

NR: não realizada.

Do total de amostras de superfícies de bancadas e de equipamentos analisadas, 44,8% foram positivas para a presença do microrganismo (Tabelas 2

e 3), conforme resultados obtidos nas análises microbiológicas. As maiores contaminações foram observadas nas bancadas do R1 (área de alimentos

Tabela 3 - *Bacillus cereus* em amostras ambientais do restaurante institucional 2, segundo o tipo de amostra e local de coleta.

| Tipo de de coleta amostra e local | Número de amostras analisadas (n° positivas) | Contagem (UFC)* |
|---|--|---------------------------|
| Ar ambiente | | |
| Áreas de alimentos não-processados: pré-preparo de vegetais; pré-preparo de carnes; antecâmara; câmara de resfriamento de carnes; seleção de cereais; preparo de sobremesas; preparo de massas; preparo de sucos; preparo de dietas especiais; recepção de gêneros. | 33 (25) | 2,0-20,0/m ³ |
| Áreas de alimentos processados: cocção; dietética. | 6 (6) | 2,0-6,0/m ³ |
| Áreas de alimentos prontos para o consumo: distribuição; <i>self-service</i> ; distribuição de refeições especiais; carros de distribuição de refeições. | 12 (10) | 2,0-8,0/m ³ |
| Outros locais: área de entrada de funcionários. | 3 (3) | 5,4-8,0/m ³ |
| Superfícies de bancadas | | |
| Áreas de alimentos não-processados: pré-preparo de vegetais; pré-preparo de carnes | 24 (8) | 0,07-0,56/cm ² |
| Áreas de alimentos processados: carnes preparadas; cocção. | 9 (0) | < 0,0024/cm ² |
| Superfícies de equipamentos | | |
| Que contatam alimentos não-processados: multiprocessador; descascador de legumes; cortador de legumes. | 15 (6) | NR |
| Que contatam alimentos processados: fatiadores. | 6 (4) | NR |

* Unidade Formadora de Colônia.

NR: não realizada.

processados - carnes preparadas) com contagens compreendidas entre 0,07 e 2,20UFC cm⁻² (Tabela 2).

Na análise dos resultados obtidos utilizando-se a PCR (Tabela 4 e Figura 1), foi observado que, dos 70 isolados de *B. cereus* investigados, 14,3% foram positivos para os três genes que codificam a hemolisina BL (*hblA*, *hblD* e *hblC*); 55,7% apresentaram um ou dois desses genes e nenhum dos três genes foi detectado em 25,7% dos isolados. Os três genes que codificam o complexo NHE (*nheA*, *nheB* e *nheC*) foram detectados em 12,8% dos isolados. Um

ou dois desses genes foram detectados em 60,0% dos isolados e nenhum dos três genes foi observado em 22,8% dos isolados. Os três genes da HBL e os três genes da NHE foram detectados em três isolados (4,3%), provenientes de amostras de ar ambiente coletada em área de alimentos não-processados (almoxarifado), de amostras de superfícies de bancada da área de pré-vegetais e de fatiador.

Entre os 70 isolados de *B. cereus* foram identificados 35 perfis toxigênicos distintos. Os 43 isolados provenientes do R1 foram agrupados em 24

Tabela 4 - Perfil toxigênico de *Bacillus cereus* isolados de amostras ambientais coletadas nos restaurantes institucionais 1 e 2.

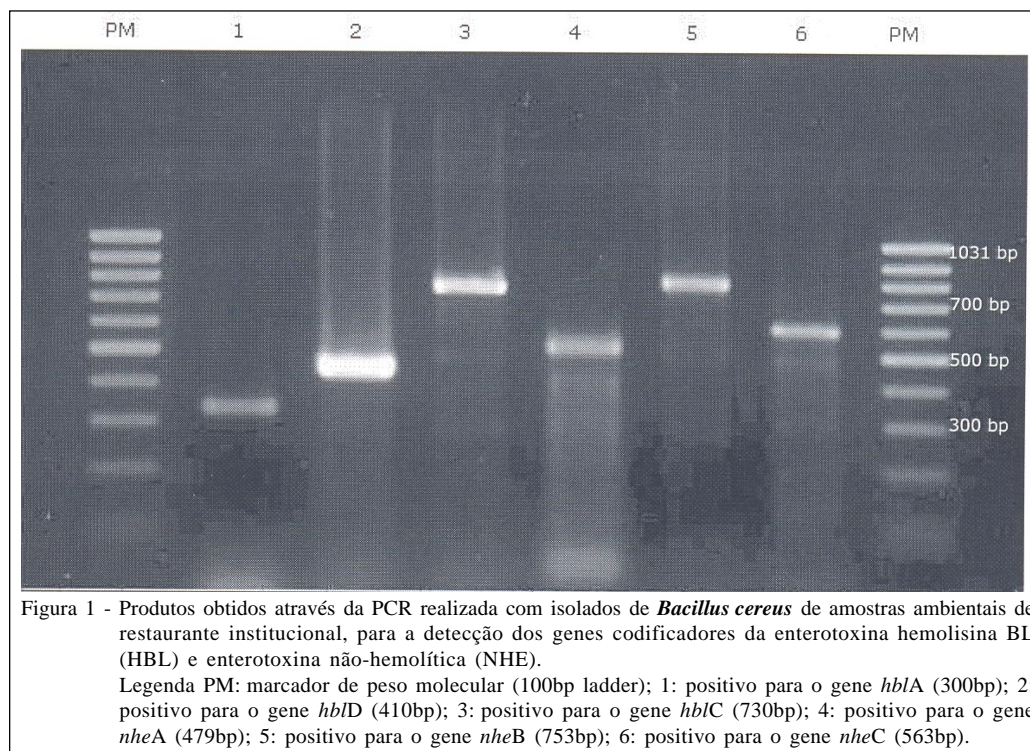
| Perfil | Origem ^a | Número de isolados (n° de positivos ao teste ELISA ^b) | HBL ^c | | | NHE ^c | | |
|--------|---------------------|---|------------------|-------------|-------------|------------------|-------------|-------------|
| | | | <i>hblA</i> | <i>hblD</i> | <i>hblC</i> | <i>nheA</i> | <i>nheB</i> | <i>nheC</i> |
| I | SB, SE, A, | 3 (3) | + | + | + | + | + | + |
| II | SB, A | 2 (2) | + | + | + | + | - | + |
| III | SE, SB | 3 (3) | + | + | + | + | - | - |
| IV | A | 3 (2) | + | + | + | + | + | - |
| V | A | 1 (1) | + | + | - | + | + | + |
| VI | A | 3 (2) | + | + | - | + | - | - |
| VII | A | 2 (1) | + | + | - | - | + | - |
| VIII | A, SE | 2 (1) | + | + | - | + | + | - |
| IX | A | 4 (0) | + | + | - | - | - | - |
| X | SE | 1 (1) | - | + | + | - | + | + |
| XI | SB | 1 (0) | - | + | + | - | - | - |
| XII | SE | 1 (1) | + | - | + | - | + | + |
| XIII | SE | 2 (0) | + | - | + | - | - | - |
| XIV | A, SB, SE | 5 (1) | - | + | - | - | - | - |
| XV | A | 3 (3) | - | + | + | + | + | + |
| XVI | A | 1 (0) | - | + | - | + | - | - |
| XVII | A | 1 (1) | - | + | - | + | + | + |
| XVIII | A | 1 (1) | - | - | + | + | + | + |
| XIX | A | 3 (2) | - | - | + | + | + | - |
| XX | A | 6 (5) | - | - | - | + | + | - |
| XXI | SB | 2 (2) | - | - | - | + | + | + |
| XXII | SE | 2 (0) | - | - | - | - | + | + |
| XXIII | A, SB | 3 (0) | - | - | - | - | - | - |
| XXIV | A, SB | 3 (3) | - | - | - | + | - | + |
| XXV | A | 1 (0) | + | + | + | - | - | - |
| XXVI | SE | 1 (1) | + | + | + | - | - | + |
| XXVII | A | 2 (2) | + | + | - | - | + | + |
| XXVIII | A | 1 (1) | - | + | - | + | + | - |
| XXIX | A | 1 (1) | - | + | + | + | - | + |
| XXX | A | 1 (1) | - | + | + | - | + | - |
| XXXI | A | 1 (0) | - | - | - | + | - | - |
| XXXII | SE | 1 (1) | + | - | + | + | + | + |
| XXXIII | SE | 1 (0) | - | - | - | - | + | - |
| XXXIV | SB | 1 (0) | - | + | + | - | - | + |
| XXXV | SB | 1 (1) | - | + | + | + | - | - |

^aSB: superfície de bancada; SE: superfície de equipamento; A: ar ambiente

^bkit BDE (Tecra). Os resultados foram obtidos de acordo com as instruções do fabricante.

^c+: foi observado produto da PCR com peso esperado;

-: não foi observado produto do PCR com peso esperado.



perfis, enquanto os 27 isolados do R2 foram agrupados em 22 perfis. Estudos recentes (HANSEN & HENDRIKSEN, 2001; GHELARDI et al., 2002; PHELPS & MCKILIP, 2002), em que foram utilizados métodos baseados na PCR, atestam a heterogeneidade em *B. cereus* quanto à presença de fatores de virulência.

O teste com o *kit* BDE (Tecra), que detecta a proteína codificada pelo gene *nheA* do complexo NHE (Lund; Granum, 1996), revelou que 61,4% dos 70 isolados de *B. cereus* testados produzem essa toxina. Estes resultados confirmam a eficiência do teste, já relatada por outros pesquisadores (LUND & GRANUM, 1996; LUND & GRANUM, 1997; HANSEN & HENDRIKSEN, 2001). Entretanto, entre os 70 isolados, oito apresentaram resultados positivos para o teste ELISA, mesmo sendo negativos para a presença do gene *nheA* utilizando-se a PCR. Cabe ressaltar que o *kit*, além de detectar proteína de 45kDa, também pode identificar o componente protéico de 105kDa do complexo NHE, embora com sensibilidade 10 vezes menor (GRANUM, 1997). De fato, o gene *nheC*, que codifica esse componente, foi detectado em cinco dos oito isolados que apresentaram resultados positivos no imunoensaio. As propriedades do teste BDE e os possíveis diferenças nas seqüências dos genes codificadores das enterotoxinas devem ser consideradas na análise comparativa entre os resultados obtidos com a aplicação do kit e com a

pesquisa de genes do complexo NHE pela PCR, como observaram HANSEN & HENDRIKSEN (2001).

A presença de *B. cereus* potencialmente produtores de enterotoxinas em amostras ambientais coletadas nos serviços de alimentação, observada através da análise dos resultados obtidos com a PCR e o teste ELISA, indica a importância do risco de contaminação de alimentos a partir dessas fontes. A identificação dos principais locais como origens potenciais do microrganismo ou de seus esporos deve ser considerada para evitar ou reduzir a contaminação dos alimentos na linha de processamento, como relatam alguns pesquisadores (GUINEBRETIERE & NGUYEN-THE, 2003). Neste trabalho, ficou evidente a importância do ar ambiente como fonte de *B. cereus* em estabelecimentos processadores de alimentos.

CONCLUSÃO

Devido à frequência com que determinadas situações são observadas em serviços de alimentação, tais como a exposição do alimento ao ar ambiente por tempo prolongado, condições de higiene de bancadas e de equipamentos inadequadas e exposição dos alimentos a temperaturas abusivas, torna-se relevante insistir na necessidade de aprimorar os procedimentos de higienização ambiental, uma vez que seu papel como fonte potencial de patógenos alimentares como *B. cereus*, tem sido evidenciado de forma indubitável.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro. Ao Prof. Dr. Tomomasa Yano do Instituto de Biologia, UNICAMP, pelo auxílio nas análises da PCR.

REFERÊNCIAS

- ANDERSSON, A. et al. What problems does the food industry have the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*? **International Journal of Food Microbiology**, v.28, n.2, p.145-155, 1995.
- BEECHER, D.J.; MACMILLAN, J.D. Characterization of the components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. **Infection and Immunity**, v.59, n.5, p.1778-1784, 1991.
- BEECHER, D.J. et al. Enterotoxic activity of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. **Infection and Immunity**, v.63, n.11, p.4423-4428, 1995.
- EVANCHO et al. Microbiological monitoring of the food processing environment. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4.ed. Washington, DC: American Public Health Association, 2001. cap.3, p.25-35.
- GHELARDI, E. et al. Identification and characterization of toxigenic *B. cereus* isolates responsible for two food-poisoning outbreaks. **FEMS Microbiology Letters**, v.208, n.1, p.129-134, 2002.
- GRANUM, P.E. *Bacillus cereus* and its toxins. **Journal of Applied Bacteriology**, Symposium Supplement, n.76, p.61S-66S, 1994
- GRANUM, P.E. *Bacillus cereus*. In: DOYLE, M.P. et al. **Food microbiology: fundamentals and frontiers**. Washington, DC: ASM, 1997. p.327-336.
- GRANUM, P.E. et al. The sequence of the non-haemolytic enterotoxin operon from *Bacillus cereus*. **FEMS Microbiology Letters**, v.177, n.2, p.225-229, 1999.
- GUINEBRETIERE, M.H.; NGUYEN-THE, C. Sources of *Bacillus cereus* contamination in a pasteurised zucchini purée processing line, differentiated by two PCR-based methods. **FEMS Microbiology Ecology**, v.43, n.2, p.207-215, 2003.
- HANSEN, B.M.; HENDRIKSEN, N.B. Detection of enterotoxin *Bacillu cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, n.1, p.185-189, 2001.
- HEINRICH, A.H. et al. Molecular cloning and characterization of the hblA gene encoding the B component of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. **Journal Bacteriology**, v.175, p.6760-6766, 1993.
- KOTIRANTA, A. et al. Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. **Microbes and Infection**, v.2, n.2, p.189-198, 2000.
- KRAMER, J.M.; GILBERT, R.J. *Bacillus cereus* and other *Bacillus species*. In: DOYLE, M.P. **Food borne bacteria pathogens**. New York: Marcel Dekker, 1989. p.21-69.
- LUND, T.; GRANUM, P.E. Characterisation of a non-haemolytic enterotoxin complex from *Bacillus cereus* isolated after a food borne outbreak. **FEMS Microbiology Letters**, v.141, n.2-3, p.151-156, 1996.
- LUND, T.; GRANUM, P.E. Comparison of biological effect of the two different enterotoxin complexes isolated from three different strains of *Bacillus cereus*. **Microbiology** (Reading, England), v.143, pt.10, p.3329-3336, 1997.
- PHELPS, R.J.; MCKILLIP, J.L. Enterotoxin production in natural isolates of Bacillaceae outside the *Bacillus cereus* group. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.6, p.3147-3151, 2002.
- RHODEHAMEL, E.J.; HARMON, S.M. *Bacillus cereus*. In: FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Bacteriological analytical manual**. 8.ed. Arlington: Association of Official Analytical Chemists International, 1998. cap.14, p.14.01-14.08.
- RYAN, P.A. et al. Molecular cloning and characterization of the genes encoding the L₁ and L₂ components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. **Journal Bacteriology**, v.179, n.8, p.2551-2556, 1997.
- SAMBROOK, J. et al. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. 120p.
- SHARIF, F.A.; ALAEDDINOGLU, G.A. Rapid and simple method for staining of the crystal protein of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Industrial Microbiology**, v.3, p.227-229, 1988.