

Ocorrência de *Bacillus cereus* em Leite Comercializado nos Estados do Paraná, Santa Catarina e São Paulo

Occurrence of *Bacillus cereus* in Milks Traded in Paraná, Santa Catarina and São Paulo States

Maíke Tais Maziero Montanhini^{a*}; José Paes de Almeida Nogueira Pinto^b; Luciano dos Santos Bersot^c

^aPrograma de Pós Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, PR, Brasil

^bFaculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, SP, Brasil

^cUnidade de Estudos em Alimentos, Universidade Federal do Paraná, Campus Palotina, PR, Brasil

*E-mail: maikemaziero@yahoo.com.br

Recebido: 23 de agosto de 2011; Aceito: 20 de dezembro de 2011.

Resumo

Bacillus cereus é uma bactéria que desperta grande preocupação do setor laticínista. A combinação das características termodúrica e psicrotrófica denota seu grande potencial deteriorante, além do perigo que representa à saúde pública por ser bactéria patogênica. A presença de *B. cereus* foi avaliada em 260 amostras, sendo 100 de leite pasteurizado, 110 de leite *ultra high temperature* (UHT) e 50 de leite em pó, pelo método quantitativo (plaqueamento direto) e pelo método qualitativo (enriquecimento seletivo). Das amostras de leite pasteurizado avaliadas pelo método quantitativo, 19% foram positivas para *B. cereus*, com média de 1,25 ($\pm 0,27$) log unidades formadoras de colônias (UFC)/ml. Para o leite em pó, 16% das amostras foram positivas, com média de 2,00 ($\pm 0,36$) log UFC/g. O leite UHT não apresentou resultados dentro do limite de detecção do método de plaqueamento direto (>10 UFC/ml) para nenhuma das amostras avaliadas. Pelo método qualitativo 24% das amostras de leite pasteurizado, 34% de leite em pó e 16,4% de leite UHT foi positiva para *B. cereus*. Para as amostras de leite pasteurizado e leite em pó não houve diferença significativa ($P > 0,05$) na positividade entre os métodos quantitativo e qualitativo. Os resultados do presente trabalho ressaltam que, mesmo em pequenas quantidades, *B. cereus* está presente não apenas em leite pasteurizado, mas também em produtos lácteos processados a altas temperaturas (leite UHT) e desidratados (leite em pó).

Palavras-chave: *Bacillus*. Laticínios. Contaminação de Alimentos.

Abstract

Bacillus cereus is a bacterium that arouses great concern on dairy sector. Its psychrotrophic and thermotrophic behavior confers great spoiling potential and its pathogenicity is extremely worrynig to public health. This study evaluated the presence of *B. cereus* in 260 samples, from which 100 was pasteurized milk, 110 was UHT milk and 50 was milk powder. The techiques used were both quantitative (direct plating) and qualitative (selective enrichment) methods. 19% of pasteurized milk samples evaluated by the quantitative method were positive for *B. cereus*, with an average contamination of 1.25 (± 0.27) log CFU/ml. For milk powder, 16% of the samples was positive for this microorganism, with an average of 2.00 (± 0.36) log CFU/g. UHT milk samples did not show results within the detection limit of the direct plating method (> 1 log CFU/ml). Regarding the qualitative method, 24% of the pasteurized milk samples, 34% of milk powder and 16.4% of UHT milk was positive for *B. cereus*. There was no significant difference ($P < 0.05$) by quantitative and qualitative methods for pasteurized milk and milk powder samples. The results concludes that, even in small amounts, *B. cereus* is present in processed dairy products, either in high temperature processes (UHT) and dried (powder milk) and pasteurized milk.

Keywords: *Bacillus*. Dairy Products. Food Contamination.

1 Introdução

Bacillus cereus é uma bactéria ambiental, gram-positiva e formadora de esporos¹. Sua temperatura ótima para multiplicação varia de 25 a 37 °C, mas existem espécies capazes de se multiplicar entre 3 e 75 °C¹⁻³. A bactéria *B. cereus* é responsável por dois tipos de doenças de origem alimentar: a infecção chamada de síndrome diarreica, provocada por uma enterotoxina produzida *in vivo*, ou seja, produzida no intestino do hospedeiro; e a síndrome emética, intoxicação atribuída a toxina pré-formada no alimento^{1,4-6}.

A ocorrência de *B. cereus* já foi relatada em leite *in natura*^{7,8}, pasteurizado⁸⁻¹², leite *ultra high temperature* (UHT)^{11,13}, leite em pó⁹, leites fermentados⁹, sorvetes^{9,14} e outros derivados lácteos em diversos países.

B. cereus é considerado um micro-organismo termodúrico, uma vez que seus esporos podem sobreviver aos processamentos térmicos utilizados na indústria de alimentos¹⁵⁻¹⁷. Além disso, algumas linhagens são caracterizadas como psicrotróficas, ou seja, capazes de se multiplicar em temperatura de refrigeração^{3,18,19}. A combinação das características termodúrica e psicrotrófica em espécie microbiana denota seu grande potencial deteriorante^{19,20}.

B. cereus geralmente sintetiza uma variedade de enzimas, entre elas, as proteases e lipases. Estas enzimas são responsáveis pelo desenvolvimento de atributos sensoriais indesejáveis em produtos lácteos²¹. As proteases podem causar geleificação e provocar a formação de sabor amargo em leite UHT¹³ e diminuição na solubilidade de leite em pó^{22,23}, além

de queda no rendimento na fabricação de queijos^{24,25}. As lipases atuam sobre os ácidos graxos do leite, causando *off flavor* em leite pasteurizado, UHT, leite em pó e queijos^{22-24,26}.

Não existe na legislação brasileira um regulamento específico para *B. cereus* em leite e nos derivados lácteos, com exceção para o leite em pó, em que é estabelecido o limite de $5,0 \times 10^3$ unidades formadoras de colônias (UFC)/g²⁷.

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a ocorrência de *B. cereus* em leite pasteurizado, leite UHT e leite em pó de variadas marcas comerciais disponíveis no mercado nacional por meio de duas metodologias: uma quantitativa (plaqueamento direto) e outra qualitativa (enriquecimento seletivo).

2 Material e Métodos

Entre março e dezembro de 2010 foram avaliadas 110 amostras de 19 marcas diferentes de leite UHT, 100 amostras de 18 marcas de leite pasteurizado e 50 amostras de 16 marcas de leite em pó, coletadas no comércio dos Estados do Paraná, Santa Catarina e São Paulo, totalizando 260 amostras disponíveis no mercado nacional, dentro do prazo de validade.

As amostras de leite pasteurizado foram mantidas a 4 °C até o momento das análises. As amostras de leite em pó foram mantidas em temperatura ambiente e as amostras de leite UHT foram incubadas a 35 °C por 7 dias antes da execução das análises, conforme recomendação da Portaria 146²⁸.

Foram utilizadas duas metodologias para a avaliação de *B. cereus*, sendo uma quantitativa (plaqueamento direto) e outra qualitativa (enriquecimento seletivo). A avaliação quantitativa de *B. cereus* foi realizada por plaqueamento seletivo em ágar manitol-gema de ovo-polimixina B (MYP). Após incubação a 30 °C por 18-40 horas, as colônias características de *B. cereus* foram submetidas à identificação bioquímica²⁹.

Para a avaliação qualitativa de *B. cereus*, foi realizado o enriquecimento seletivo em caldo de soja triptona (TSB) adicionado de polimixina B, seguido de incubação a 30 °C por 24-30 horas. O plaqueamento seletivo foi feito em agar manitol-gema de ovo-polimixina B (MYP). Após incubação a 30 °C por 18-40 horas, as colônias características de *B. cereus* foram submetidas à identificação bioquímica²⁹.

A presença de *B. cereus* foi confirmada quando a cultura apresentou resultado positivo na prova de utilização anaeróbica da glucose, positivo na decomposição da tirosina, positivo na prova de Voges-Proskauer, positivo na redução do nitrato a nitrito e positivo na resistência à lisozima²⁹.

As frequências de positividade para a avaliação qualitativa de *B. cereus*, entre os diferentes produtos e métodos analíticos, foram comparadas por meio de teste de hipótese para diferenças entre proporções de vários grupos, com aplicação de Teste de Qui-Quadrado exato de Fisher. Os dados da avaliação quantitativa de *B. cereus* foram comparados pelo teste T de Student, uma vez que apresentaram distribuição normalizada (Teste de Shapiro-Wilk) e grupos homocedásticos (Teste de Bartlett). Todas as avaliações foram feitas com 95% de

confiabilidade, utilizando-se o programa estatístico “Statistica versão 8.0”.

3 Resultados e Discussão

Das amostras de leite pasteurizado avaliadas pelo método quantitativo, 19% foram positivas para *B. cereus*, com contagens entre 1,00 e 1,74 log UFC/ml. Para o leite em pó, 16% das amostras foram positivas, com contagens variando de 1,70 a 2,60 log UFC/g. O leite UHT não apresentou resultados dentro do limite de detecção do método (>1 log UFC/ml) para nenhuma das amostras avaliadas (Tabela 1).

Tabela 1: Resultados de contagem de *B. cereus* pelo método quantitativo em 260 amostras de leite pasteurizado, leite em pó e leite UHT

Produto	Amostras positivas N (%)	Média ¹ (log UFC/ml)
Leite Pasteurizado	19 (19%)	1,25 (±0,27) ^{B2}
Leite em pó	8 (16%)	2,00 (±0,36) ^A
Leite UHT	0	-

¹Resultados expressos como média ± desvio padrão

²Resultados com letras distintas na mesma coluna diferem significativamente pelo teste T de student (P<0,05).

Comparando-se os resultados, foi observado que o leite em pó apresentou maior contaminação por *B. cereus* (P<0,05) do que leite pasteurizado. Os resultados foram de 2,00 (±0,36) log UFC/g para leite em pó e 1,25 (±0,27) log UFC/ml para leite pasteurizado (Tabela 1).

Os resultados encontrados no presente trabalho foram menores que os relatados por Larsen e Jorgensen¹⁰, que encontraram 56% das amostras de leite pasteurizado contaminadas por *B. cereus*, sendo que 45% destas apresentaram contagens superiores a 3,00 log UFC/ml.

Pelo teste qualitativo, 24% das amostras de leite pasteurizado, 34% de leite em pó e 16,4% de leite UHT foram positivas para *B. cereus* (Tabela 2). Em Ribeirão Preto-SP, Rezende-Lago *et al.*¹¹ encontraram, utilizando a mesma técnica, 96,7% das amostras de leite pasteurizado, 73,3% de leite em pó e 13,3% de leite UHT contaminado por *B. cereus*. Vidal-Martins *et al.*¹³ constataram a presença dessa bactéria em 11,8% de amostras de leite UHT comercializadas em São José do Rio Preto-SP.

Tabela 2: Resultados da pesquisa de *B. cereus* pelo método qualitativo em 260 amostras de leite pasteurizado, leite em pó e leite UHT

Produto	Amostras positivas	Porcentagem
Leite Pasteurizado	24	24,0 %
Leite em pó	17	34,0 %
Leite UHT	18	16,4%

Para as amostras de leite pasteurizado e leite em pó não houve diferença significativa ($P>0,05$) na positividade entre os métodos quantitativo e qualitativo (Tabela 3). Para as amostras de leite UHT, *B. cereus* foi isolado somente pelo método qualitativo (enriquecimento seletivo), indicando que este micro-organismo está presente em pequenas quantidades, abaixo do limite de detecção método quantitativo (>10 UFC/ml).

O método qualitativo é indicado para amostras processadas termicamente, nas quais as contagens bacterianas são baixas, muitas vezes abaixo do limite de detecção do método quantitativo.

Tabela 3: Resultados das 260 amostras de leite pasteurizado, leite em pó e leite UHT positivas para *B. cereus* pelos métodos quantitativo e qualitativo

Produto	Amostras analisadas	Amostras positivas no método quantitativo	Amostras positivas no método qualitativo
Leite Pasteurizado	100	19 ^a	24 ^{ab}
Leite em pó	50	8 ^a	17 ^a
Leite UHT	110	0 ^{Bb}	18 ^{Ab}
Total	260	27 ^B	59 ^A

Resultado com letras maiúsculas distintas na mesma linha diferem significativamente pelo teste de Qui-quadrado exato de Fisher ($P<0,05$)
Resultado com letras minúsculas distintas na mesma coluna diferem significativamente pelo teste de Qui-quadrado exato Fisher ($P<0,05$)

As amostras de leite em pó foram as que apresentaram maior positividade, seguida pela positividade nas amostras de leite pasteurizado. A baixa atividade de água do leite em pó garante sua estabilidade²², no entanto, quando reconstituído e armazenado em condições inadequadas, pode representar um risco potencial à saúde do consumidor, uma vez que os esporos presentes podem passar para a forma vegetativa³⁰.

A presença de *B. cereus* em produtos lácteos pode indicar alta contagem de esporos no leite cru, tratamento térmico (tempo/temperatura) insuficiente para a inativação dos esporos ou contaminação pós-processamento^{7,11,31}.

Os esporos de *B. cereus* germinam após o tratamento térmico do leite. A temperatura ótima de ativação é de 65 a 75 °C, ou seja, a faixa de temperatura utilizada na pasteurização do leite. Cerca de 95% dos esporos podem ser ativados pela pasteurização²⁰. A germinação de esporos de *B. cereus* psicrotróficos pode ocorrer a 7 °C, o que pode ser considerado um problema para produtos lácteos^{3,10}.

A contaminação por *B. cereus* em leite pasteurizado pode aumentar significativamente durante a estocagem. Larsen e Jorgensen¹⁰ encontraram baixos níveis de contaminação (<10 a 10^2 UFC/ml) em duas de 27 amostras de leite recém-pasteurizado, no entanto, após 8 dias a 7 °C, as contagens ultrapassaram 10^5 UFC/ml e 24 das 27 amostras estavam

contaminadas. Este é um fato importante a ser considerado, pois a positividade pode ser maior ou menor em uma amostragem dependendo do período do prazo de validade das amostras.

A presença de *B. cereus* em produtos lácteos deve ser considerada um problema para a indústria e para o consumidor, devido ao seu potencial deteriorante e patogênico. Os resultados do presente trabalho ressaltam que, mesmo em pequenas quantidades, *B. cereus* está presente não apenas em leite pasteurizado, mas também em produtos lácteos processados a altas temperaturas (leite UHT) e desidratados (leite em pó).

4 Conclusão

B. cereus foi detectado em leite pasteurizado, leite UHT e leite em pó. A técnica de enriquecimento seletivo possibilitou a detecção deste micro-organismo em amostras que não apresentaram contagem pelo método de plaqueamento direto, indicando que a contaminação está abaixo dos limites de detecção do método. No entanto, mesmo estando presente em baixos níveis, é imperativo o monitoramento de *B. cereus* em produtos lácteos devido ao seu grande potencial deteriorante e patogênico.

Agradecimento

Agradecemos ao CNPq pelo apoio financeiro obtido através do Edital Universal 14/2009 Processo 471703/2009-5.

Referências

1. Drobniowski FA. *Bacillus cereus* and related species. Clin Microbiol Rev 1993;6:324-38.
2. Kramer JM, Gilbert RJ. *Bacillus cereus* and other *Bacillus* Species. In: Doyle MP. Food born bacterial pathogens. New York: Marcel Dekker; 1989. p.21-70.
3. Dufrenne J, Bijwaard M, Giffel M, Beumer R, Notermans S. Characteristics of some psychrotrophics *Bacillus cereus* isolates. Int J Food Microbiol 1995;27:175-83.
4. Wijnands LM, Dufrenne JB, Van Leusden FM, Characterization of *Bacillus cereus*, 2002. [acesso em 28 out. 2009]. Disponível em <http://rivm.openrepository.com/rivm/handle/10029/9159>.
5. Arnesen LPS, Fagerlund A, Granum PE. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. FEMS Microbiol Rev 2008;32(4):579-606.
6. Senesi S, Ghelardi E. Production, secretion and biological activity of *Bacillus cereus* enterotoxins. Toxins 2010;2:1690-703.
7. Christiansson A, Bertilsson J, Svensson B. *Bacillus cereus* spores in raw milk: Factors affecting the contamination of milk during the grazing period. J Dairy Sci 1999;82:305-14.
8. Bartoszewicz H, Hansen BM, Swiecicka I. The members of the *Bacillus cereus* group are commonly present contaminants of fresh and heat-treated milk. Food Microbiol 2008;25:588-96.
9. Wong HC, Chang MH, Fan JY. Incidence and characterization of *Bacillus cereus* isolates contaminating dairy products. App. Environ. Microbiol 1988;54:699-702.

10. Larsen HD, Jorgensen K. Growth of *Bacillus cereus* in pasteurized milk products. *Int J Food Microbiol* 1999;46:173-6.
11. Rezende-Lago NCM, Rossi Junior OD, Vidal-Martins AMC, Amaral LA. Occurrence of *Bacillus cereus* in whole milk and enterotoxigenic potential of the isolated strains. *Arq Bras Med Vet Zoot* 2007;59(6):1563-9.
12. Zhou G, Liu H, He J, Yuan Y, Yuan Z. The occurrence of *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis* and *B. mycoides* in Chinese pasteurized full fat milk. *Int J Food Microbiol* 2008;121(2):195-200.
13. Vidal-Martins AA, Rossi Junior OD, Rezende-Lago NC. Mesophilic heterotrophic microorganisms and spore forming bacteria from *Bacillus cereus* group in ultra high temperature milk. *Arq Bras Med Vet Zoot* 2005;57(3):396-400.
14. Zhou GD, Zheng L, Dou QC, Yuan Z. Occurrence of psychrotolerant *Bacillus cereus* group strains in ice creams. *Int J Food Microbiol* 2010;137:143-6.
15. Bradshaw JG, Peeler JT, Twedt RM. Heat resistance of ileal loop reactive *Bacillus cereus* strains isolated from commercially canned food. *Appl Microbiol* 1975;30(6):943-5.
16. Gaillard S, Leguerinel I, Mafart P. Model for combined effects of temperature, pH and water activity on thermal inactivation of *Bacillus cereus* spores. *J Food Sci* 1998;63:887-9.
17. Cronin UP, Wilkinson MG. *Bacillus cereus* endospores exhibit a heterogeneous response to heat treatment and low-temperature storage. *Food Microbiol* 2008;25(2):235-43.
18. Garcia-Armesto MR, Sutherland AD. Temperature characterization of psychrotrophic and mesophilic *Bacillus* species from milk. *J Dairy Res* 1997;64:261-70.
19. Matta H, Punj V. Isolation and identification of lipolytic, psychrotrophic, spore forming bacteria from raw milk. *Int J Dairy Technol* 1999;52(2):59-62.
20. Meer RR, Baker J, Bodyfelt FW, Griffiths, MW. Psychrotrophic *Bacillus* spp in fluid milk products: a review. *J Food Prot* 1991;54:969-79.
21. Chen L, Coolbear T, Daniel RM. Characteristics of proteinases and lipases produced by seven *Bacillus* sp isolated from milk powder production lines. *Int Dairy J* 2004;14:495-504.
22. Chen L, Daniel RM, Coolbear T. Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. *Int Dairy J* 2003;13(4):255-75.
23. Celestino EL, Iyer M, Roginski H. The effects of refrigerated storage of raw Milk on the quality of whole milk powder stored for different periods. *Int Dairy J* 1997;7:119-27.
24. Furtado MM. Principais problemas dos queijos: causas e prevenção. São Paulo: Fonte; 2005.
25. Cardoso RR. Influência da microbiota psicrotrófica no rendimento de queijo minas frescal elaborado com leite estocado sob refrigeração. Viçosa. Dissertação [Mestrado em Microbiologia Agrícola] - Universidade Federal de Viçosa; 2006.
26. Andersson RE, Danielsson G, Hedlund CB, Svensson SG. Effect of a heat-resistant microbial lipase on flavor of ultra-high-temperature sterilized milk. *J Dairy Sci* 1981;6:375-9.
27. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos, 2 de janeiro de 2001, Brasília, 2001.
28. Ministro de Estado da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária (Brasil). Portaria 146. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite UAT. Brasília 7 mar. 1996.
29. BAM - Bacteriological Analytical Manual. Chapter 12: *Bacillus cereus*, 2001.
30. Barros VRM, Panetta JC, Miguel O. Ocorrência e níveis de *Bacillus cereus* no leite em pó comercializado na capital do Estado de São Paulo, Brasil – 1987-1988. *Rev Ed Cont* 2001;4(1):45-51.
31. Svensson B, Ekelund K, Ogura H, Christiansson A. Characterisation of *Bacillus cereus* isolated from milk silo tanks at eight different dairy plants. *Int Dairy J* 2004;14:17-27.