

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS**

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE *Bacillus cereus* s.s.
EM LEITE CONTAMINADO EXPERIMENTALMENTE E
PASTEURIZADO AO LONGO DA *SHELF-LIFE***

**Joyce Aparecida Santos Lima
Médica Veterinária**

2019

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS**

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE *Bacillus cereus* s.s.
EM LEITE CONTAMINADO EXPERIMENTALMENTE E
PASTEURIZADO AO LONGO DA *SHELF-LIFE***

Joyce Aparecida Santos Lima

Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria Centola Vidal

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Medicina Veterinária Preventiva).

2019

S237a Lima, Joyce Aparecida Santos
Análise da expressão gênica de *Bacillus cereus*
s.s. em leite contaminado experimentalmente e
pasteurizado ao longo da shelf-life / Lima Joyce
Aparecida Santos. -- Jaboticabal, 2019
34 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual
Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias, Jaboticabal

1. Biofilmes. 2. Biologia Molecular. 3. Expressão
gênica. 4. Microbiologia. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da
Unesp.

Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias,
Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

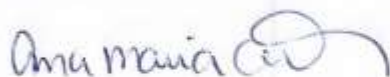
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE *Bacillus cereus* s.s. EM LEITE CONTAMINADO EXPERIMENTALMENTE E PASTEURIZADO AO LONGO DA SHELF-LIFE

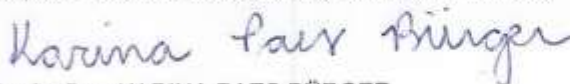
AUTORA: JOYCE APARECIDA SANTOS LIMA

ORIENTADORA: ANA MARIA CENTOLA VIDAL

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em MEDICINA VETERINÁRIA, área: Medicina Veterinária Preventiva pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. ANA MARIA CENTOLA VIDAL
Departamento de Medicina Veterinária / FZEA / USP - Pirassununga/SP



Profa. Dra. KARINA PAES BÜRGER
Depto de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Profa. Dra. MIRELE DAIANA POLETI
Departamento de Medicina Veterinária-FZEA/USP / Pirassununga/SP

Jaboticabal, 10 de abril de 2019

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Joyce Aparecida Santos Lima – nascida em 27 de novembro de 1994, no município de São Paulo, ingressou no curso de graduação em Medicina Veterinária na Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo (FZEA/USP) no ano de 2012. Durante a graduação, participou do Grupo de Estudos em Higiene e Inspeção de Produtos de Origem Animal (GEHIPOA), da Empresa Júnior de Medicina Veterinária (Emvep Jr.) e foi bolsista de Iniciação Científica pelo CNPq por dois projetos consecutivos, sob orientação da Profa. Dra. Ana Maria Centola Vidal. Possui experiência nas áreas de segurança dos alimentos, higiene e inspeção sanitária de produtos de origem animal, tecnologia e microbiologia de produtos de origem animal.

AGRADECIMENTOS

À Deus agradeço pelas oportunidades, por iluminar meu caminho e me conceder sabedoria para lidar com as adversidades.

Aos meus pais, Cleusa dos Santos Lima e José Dilson Carneiro Lima, por todo amor, incentivo e compreensão pelos anos longe e por serem a minha fortaleza.

Aos meus irmãos, Daniel e Eric, por serem sempre meus exemplos de profissionais dedicados e íntegros.

À minha orientadora, Profa. Dra. Ana Maria Centola Vidal, pela amizade, conhecimentos, paciência e por todos os anos nos quais tive o privilégio de ser sua orientada.

Ao Prof. Dr. Heidge Fukumasu por todos os ensinamentos e paciência.

Às técnicas de laboratório, Arina Rochetti e Andreia Nakashima, por toda a paciência, ensinamentos e amizade que adquirimos ao longo desta jornada.

Aos meus amigos (Victor, Bruna, Helen, Lara, Mariana Chiconini, Nuno, Gabriela, Luciana e Mariana Saragon) por todo incentivo e apoio ao longo desta trajetória e de tantas outras que já compartilhamos.

Aos meus companheiros de jornada, Gabriel, Kadu e Higor, por toda ajuda, incentivo e amizade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento à execução do projeto de pesquisa (processo 2015/20874-0).

À UNESP e aos funcionários do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária Preventiva.

Aos técnicos, colegas e funcionários da FZEA/USP, Pirassununga, pela atenção disponibilizada.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

SUMÁRIO

RESUMO.....	ii
ABSTRACT.....	iii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1. Gênero <i>Bacillus</i>	2
2.2. Grupo <i>Bacillus cereus</i>	2
2.3. Genes de virulência do <i>B. cereus</i>	4
2.3.1. Gene <i>plcr</i>	4
2.3.2. Complexo <i>hbl</i>	5
2.3.3. Complexo <i>nhe</i>	6
2.3.4. Gene <i>npr</i>	6
2.4. Métodos de detecção.....	7
2.5. <i>B. cereus</i> e a saúde pública.....	8
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3.1. Obtenção do leite tindalizado.....	12
3.2. Contaminação experimental.....	12
3.3. Análise da expressão gênica por PCR em tempo real.....	13
3.4. Análise estatística.....	17
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
CONCLUSÃO.....	24
REFERÊNCIAS.....	26

ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE *Bacillus cereus* s.s. EM LEITE CONTAMINADO EXPERIMENTALMENTE E PASTEURIZADO AO LONGO DA *SHELF-LIFE*

RESUMO – *Bacillus cereus sensu stricto* (s.s.) tem o potencial de produzir toxinas gastrointestinais, resistir a condições adversas, como tratamentos térmicos e pasteurização; produzir enzimas e formar biofilmes, causando diversos surtos ao redor do mundo relacionados com a sua presença em alimentos contaminados. Entretanto, não é bem elucidado o dano que o tratamento térmico causa à esta bactéria e à sua expressão gênica. Assim, o objetivo deste estudo foi verificar se a pasteurização e o armazenamento em refrigeração ao longo da *shelf-life* seriam capazes de influenciar a expressão dos genes relacionados com a produção de toxinas diarreicas, proteases e à formação de biofilmes em leite experimentalmente contaminado com *B. cereus* s.s.. Trinta litros de leite cru foram tinalizados e experimentalmente contaminados com aproximadamente 10^8 UFC.mL⁻¹ de *B. cereus* s.s. SAMN07414939 (Bio Project PRJNA390851). Uma amostra foi coletada logo após a contaminação (LTC – T0) e então o leite foi pasteurizado e envasado em embalagens de polietileno com 1L de capacidade (LCP - T1, T2 e T3) e mantido em refrigeração até o momento das análises. Posteriormente, a extração de RNA total das amostras foi realizada, seguido pelo cDNA e qPCR utilizando os genes *plcr*, *hblA*, *hblC*, *hblD*, *nheA*, *nheB*, *nheC*, *cytk* e *npr* para avaliação da expressão gênica. A expressão dos genes se manteve ao longo de toda a *shelf-life*, sem diferença estatística significativa entre os momentos avaliados para os genes *plcr*, *hblA*, *hblC*, *hblD*, *nheA*, *nheB*, *nheC*, *cytk* e *npr*, os quais persistiram com seu potencial de causar síndrome diarreica, formar biofilme e produzir proteases. Tais resultados realçam a importância de uma matéria-prima de qualidade e boas práticas de fabricação e higiene dentro das plantas manipuladoras de alimentos.

Palavras-chave: Biofilmes, Biologia Molecular, Expressão gênica, Microbiologia.

***Bacillus cereus* s.s. GENE EXPRESSION ANALYSIS IN MILK
EXPERIMENTALLY CONTAMINATED AND PASTEURIZED ALONG THE SHELF-
LIFE**

ABSTRACT - *Bacillus cereus sensu stricto* (s.s.) has the potential to produce gastrointestinal toxins, resists to adverse conditions, such as heat-treatment and pasteurization; the ability to form biofilms and produce enzymes, causing several outbreaks worldwide related to its presence in contaminated food. However, it is not well elucidated what damage the pasteurization causes to this bacterium and its gene expression. Thus, the aim of this study was to verify if pasteurization and storage during shelf-life in refrigeration were able to influence the expression of genes related to the production of diarrheal toxins, proteases and biofilm formation in milk experimentally contaminated with *B. cereus* s.s. Thirty liters of raw milk were sterilized by tyndallization and experimentally contaminated with 10^8 vegetative cells of *B. cereus* s.s. SAMN07414939 (Bio Project PRJNA390851). A sample was collected right after contamination (LTC – 0h); then the milk was pasteurized and then packed in 1 L capacity polyethylene bags and samples LCP - T1, T2 and T3 were collected. Posteriorly, the total RNA were extracted from the samples and the cDNA and qPCR were performed using the primers *plcr*, *hblA*, *hblC*, *hblD*, *nheA*, *nheB*, *nheC*, *cytk* and *npr* for gene expression quantification. The gene expression was maintained along the shelf-life, without significant statistical difference between the moments evaluates for the *plcr*, *hblA*, *hblC*, *hblD*, *nheA*, *nheB*, *nheC*, *cytk* and *npr* gene expression, which persisted with its potential to cause diarrheal syndrome, form biofilm and produce proteases. These results highlight the importance of a quality raw milk and good manufacturing and hygiene practices within food handling plants.

Key-words: Biofilms, Molecular Biology, Gene Expression, Microbiology.

1. INTRODUÇÃO

O *Bacillus cereus sensu stricto* (s.s.) é considerado a espécie de maior importância dentro do grupo do *Bacillus cereus* em relação à saúde pública devido a sua resistência a condições adversas, formação de biofilme e capacidade de produção de toxinas gastroentéricas, havendo relatos em todo o mundo de surtos relacionados à sua presença em leite e derivados, carnes, ovos e arroz, causando as síndromes diarreica e emética.

A síndrome diarreica é desencadeada pela ação de pelo menos três enterotoxinas termolábeis, sendo Hemolisina BL (HBL), Enterotoxina Não Hemolítica (NHE) e Citotoxina (CYTK), todas produzidas na fase exponencial de multiplicação da bactéria no intestino delgado do hospedeiro causando diarreias agudas, dores abdominais e náuseas. A síndrome emética é causada pela ingestão de alimentos previamente contaminados com a toxina termoestável “cereulide”, cujos principais sintomas são náuseas agudas e vômitos.

Além do impacto na saúde pública, as bactérias do grupo do *B. cereus* são consideradas uma das principais causas de perdas econômicas na indústria de leite e derivados devido à produção de enzimas deteriorantes como proteases, lipases, lecitinases e fosfolipases que geram alterações de sabor, ranço e redução no rendimento industrial.

A capacidade de formação de biofilme é outra característica importante às bactérias do grupo do *B. cereus*, as quais possuem elevada capacidade de adesão em diferentes superfícies, permitindo a formação de biofilmes promovendo resistência às condições hostis ambientais e tratamentos térmicos como a pasteurização.

Uma importante forma de defesa do *B. cereus* é a esporulação. Sabe-se que após o tratamento térmico esta bactéria esporula como forma de defesa, permitindo a sua permanência no leite pasteurizado. No entanto, não é bem compreendido quais danos este tratamento térmico causa à bactéria, bem como não é bem elucidado o seu padrão de expressão gênica após tal estresse térmico.

Assim, este estudo objetivou verificar se a pasteurização foi capaz de influenciar na expressão de genes relacionados à produção de toxinas diarreicas, metaloproteinase e formação de biofilme em leite contaminado experimentalmente com isolado de *B. cereus* s.s. ao longo da *shelf-life*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Gênero *Bacillus*

Fazem parte do gênero *Bacillus* espécies de grandes bacilos gram-positivos, produtores de esporos com até 10 µm de comprimento, presentes isoladamente ou em cadeia; são catalase-positivas, anaeróbias facultativas ou aeróbias e móveis (Quinn et al., 2005). Estão distribuídas de modo amplo pelo meio ambiente, principalmente devido à sua capacidade de produzir esporos e tolerar condições extremamente adversas, como dessecação e altas temperaturas (von Stetten et al., 1999).

A maioria das espécies do gênero são microrganismos ambientais não-patogênicos (Quinn et al., 2005) e podem ser utilizadas na indústria como biopesticidas (Schnepf et al., 1998), fermentadores alimentícios (Tamang et al., 2016) e probióticos (Elshagabee et al., 2017). No entanto, algumas cepas produzem toxinas altamente patogênicas, sendo utilizadas como potenciais armas biológicas, como é o caso do *Bacillus anthracis*, que produz a toxina antraz (Helgason et al., 2004).

2.2. Grupo *Bacillus cereus*

O grupo do *Bacillus cereus* ou *Bacillus cereus sensu lato* (s.l.) é composto por oito espécies com alta similaridade genética: *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus weihenstephanensis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus cytotoxicus* e *Bacillus toyonensis* (Guinebretière et al., 2008). Outras espécies são passíveis de inclusão neste grupo: *Bacillus wiedmannii*

sp. nov (Miller et al., 2016), *Bacillus bingmayongensis* sp. nov. (Liu et al., 2014), *Bacillus manliponensis* sp. nov. (Jung et al., 2011) e *Bacillus gaemokensis* sp. nov. (Jung et al., 2010).

Guinebretière et al. (2008) sugeriu a classificação destas espécies em sete grupos filogenéticos distintos de acordo com as suas diferenças ecológicas, cepas psicrotolerantes, temperatura de multiplicação, dados moleculares, sequências de genes ribossômicos e *panC* (pantotenato sintetase). O Grupo I é composto pelo *B. pseudomycooides*; o Grupo II pelo *B. thuringiensis* e *B. cereus*; o Grupo III pelo o *B. thuringiensis*, *B. cereus* e *B. anthracis*; o Grupo IV e Grupo V pelo *B. thuringiensis* e *B. cereus*; Grupo VI, *B. thuringiensis*, *B. weihenstephanensis* e *B. mycooides*; e o Grupo VII integrado pelo *B. cereus*.

Esta classificação trouxe importantes informações à indústria de alimentos, enfatizando que as cepas pertencentes aos grupos II e VI possuem alta capacidade de multiplicação em temperaturas de refrigeração, consideradas psicrotróficas, e que os microrganismos presentes preferencialmente no grupo III possuem capacidade de produção de toxinas nocivas à saúde humana (Guinebretière et al., 2008).

A diferenciação entre as espécies de *Bacillus* spp. é amplamente baseada nas características das colônias, testes bioquímicos, atividade hemolítica, motilidade, presença de cristais de toxinas e crescimento rizoide (Quinn et al., 2005; Scheleifer e Whitman, 2009; FDA, 2012). No entanto, apenas as características fenotípicas podem ser insuficientes para classificação das espécies, tendo em vista que estes microrganismos realizam transferência de plasmídeos (Patiño-Navarrete e Sanches, 2016). Em literatura, há relatos de espécies do grupo expressando fenótipos distintos dos seus tradicionais, como uma cepa de *B. cereus* s.s. capaz de sintetizar toxinas similares às produzidas pelo *B. anthracis* devido aos plasmídeos pBCXO1 e pBCXO2 (Scarff et al., 2016). Assim, a completa diferenciação das espécies torna o uso das ferramentas de biologia molecular fundamental.

2.3. Genes de virulência do *B. cereus*

2.3.1. Gene *plcr*

O gene *plcr* é um regulador de transcrição cuja principal função é permitir a adaptação do *B. cereus* ao ambiente em que se encontra (Gohar et al., 2008). Estudos descrevem sua ação na regulação da maior parte dos fatores de virulência do *Bacillus cereus*, como os genes responsáveis pela esporulação (Gohar et al. 2008), produção de toxinas relacionadas aos complexos HBL e NHE (Agaisse et al, 1999), síntese enzimática (Kolstø e Lereclus, 2002) proteínas de superfície celular e formação de biofilme (Hsueh, 2006). Além disso, a relação do *plcr* com a produção de biofilmes vem sendo relatada como fundamental na composição da matriz extracelular, necessário para a produção da proteína “Kustakin” (Majed et al. 2016).

A capacidade de formação de biofilme é uma característica importante às bactérias do grupo do *B. cereus*, as quais possuem elevada capacidade de adesão em diferentes superfícies, permitindo a formação de biofilmes, que são comunidades bacterianas com estruturas complexas tridimensionais, que permitem a cooperação entre os microrganismos presentes, promovendo resistência às condições hostis ambientais (Pasvolsky et al., 2014). A formação destas comunidades multicelulares em materiais amplamente utilizadas na indústria de alimentos, como o aço inoxidável, dificulta ainda mais o seu controle (Domingues, 2011; Fonseca, 2016), tornando-se um importante ponto de re-contaminação, aumentando a quantidade de microrganismos no produto acabado e reduzindo o seu tempo de prateleira (Kumari e Sarkar, 2016; Vieira et al., 2008).

Silva et al. (2018) demonstraram que uma cepa de *B. cereus* s.s. manteve sua capacidade de adesão e formação de biofilme em superfície de aço inoxidável em contato com leite mesmo após a sanitização por diferentes métodos e desinfetantes. Hayrapetyan et al. (2015) analisaram a formação de biofilme em diferentes materiais e concluíram que houve maior formação destas comunidades em superfícies de aço inoxidável quando comparado a outros materiais normalmente utilizados na indústria, como poliestireno, o que demonstra que talvez este material possa ser inadequado ao uso na indústria do ponto de vista da agregação bacteriana.

Majed et al (2016) relata que superfícies constituídas por aço inoxidável, como pasteurizadores, tanques, máquinas de envase, baldes e moldes representam importantes pontos sujeitos à formação de biofilmes e fontes de recontaminação pós-pasteurização. Destaca-se ainda que não só as tubulações e equipamentos constituídos de aço inoxidável representam um risco à formação de biofilmes.

2.3.2. Complexo *hbl*

A síndrome diarreica é desencadeada pela ação de pelo menos três enterotoxinas termolábeis, sendo Hemolisina BL (HBL), Enterotoxina Não Hemolítica (NHE) e Citotoxina (CYTK), todas produzidas na fase exponencial de multiplicação da bactéria no intestino delgado do hospedeiro (Beecher et al., 1995; Portuondo, 2012). Seu período de incubação é de 8 a 16 horas, causando diarreias agudas, dores abdominais e náuseas, sintomas associados ao impacto das toxinas na integridade da membrana plástica do epitélio intestinal (Fonseca, 2016). De acordo com Viegas et al. (2015), 23% dos casos de surtos alimentares investigados em Portugal foram causados por enterotoxinas diarreicas de bactérias do grupo do *B. cereus*. Em indivíduos saudáveis, é necessária a ingestão de aproximadamente 10^5 a 10^7 Unidades Formadoras de Colônias por grama (UFC/g) de alimento consumido para acarretar à síndrome diarreica (Ehling-Schulz et al., 2004).

O complexo HBL, elucidado na figura 1, é composto por três enterotoxinas: um componente de ligação (B) e dois componentes líticos (L_1 e L_2) (Jay et al., 2005; Soleimani et al., 2017) encodadas pelos genes *hblA*, *hblC* e *hblD*, respectivamente, que induzem hemólise em células Vero e CHO (células de ovário de hamster chinês), aumento da permeabilidade vascular, dermonecrose e necrose (Soleimani et al., 2017). Os três genes responsáveis pela produção das proteínas deste complexo estão organizados em conjunto em um único operon (Schoeni e Wong, 2005) e a sua identificação em um único isolado demonstra alta associação e potencial de funcionalidade dos seus produtos (Hansen e Hendriksen, 2001).

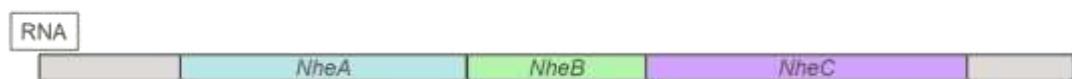
Figura 1. Complexo *hbl* – esquema do operon *hbl*, o qual contém os genes *hblA*, *hblC* e *hblD*.



2.3.3. Complexo *nhe*

O complexo não-hemolítico (NHE) também é composto por três componentes proteicos, A, B e C, encodados pelos genes *nheA*, *nheB* e *nheC*, respectivamente, presentes no mesmo operon (Hansen e Hendriksen, 2001). Fagerlund et al. (2004) descreveram a Citotoxina K (CYTK) como formadora de poros, necrótica, hemolítica e altamente tóxica a células intestinais epiteliais humanas (Hardy et al., 2001). A proteína formada é considerada um fator primário para a ocorrência da síndrome diarreica causada pelo *Bacillus cereus* (Ngamwongsatit et al., 2008).

Figura 2. Complexo *nhe* – esquema do operon *nhe*, o qual contém os genes *nheA*, *nheB* e *nheC*.



2.3.4. Gene *npr*

Além da sua grande importância quanto ao seu potencial formador de biofilmes, as bactérias do grupo do *Bacillus cereus* são consideradas uma das principais causas de perdas econômicas na indústria de leite e derivados (Meer et al., 1991; Brown, 2000). Estes microrganismos produzem enzimas extracelulares, como as proteases, lipases, lecitinases e fosfolipases que causam alterações de sabor, ranço e redução no rendimento industrial (Simões et al., 2010; Jonghe et al., 2010; Kumari e Sarkar, 2016). Estima-se que de 20 a 30% dos problemas de vida de

prateleira dos produtos lácteos estejam relacionadas à presença destas enzimas (Meer et al., 1991; Samarzija et al., 2012).

A atividade lipolítica das bactérias do grupo do *B. cereus* pode causar hidrólise da gordura, com liberação de ácidos graxos e formação de ácido butírico, conferindo o sabor saponificado ao produto, que é notado ao longo do período de maturação e comum em queijos de maturação prolongada, como Emmental, Gruyère e Parmesão (Furtado, 2005). Em leite UAT a lipase causa alterações no sabor como ranço, amargo, butírico e de sabão ao longo do armazenamento do produto (Andersson et al., 1995). A lecitinase atua na membrana fosfolipídica do glóbulo de gordura do leite, ocasionando o *bitty cream*, defeito tecnológico em que há aglomeração dos glóbulos de gordura (Jonghe et al., 2010).

O gene *npr* (neutral protease gene), regulado pelo *plcr*, é o responsável pela produção de proteases neutras, que são similares às metaloproteinases (Bach et al., 1999). A atividade proteolítica das bactérias do grupo do *B. cereus* é causada pelas proteases sintetizadas por cepas psicrotróficas, com estabilidade térmica (Mitchell et al., 1986) e resistência a temperatura de 149°C por 7 segundos, tempo similar ao tratamento UAT (Barach et al., 1976). A proteólise gera degradação da caseína, liberando peptídeos de baixo peso molecular, causando sabores desagradáveis ao leite (Janstová et al., 2006), aumento da viscosidade, com formação de gel em leite UAT (Vidal-Martins et al., 2005) e redução do rendimento industrial (Cardoso, 2006).

2.4 Métodos de detecção

A detecção de bactérias do grupo do *B. cereus* produtores de toxinas diarreicas e eméticas pode ser realizada por métodos moleculares, que identificam a presença dos genes codificadores específicos ou por métodos imunológicos, que detectam a presença de toxinas, sendo os últimos disponíveis em kits comerciais (Ehling-Schulz et al., 2004). Wehrle et al. (2009) compararam as respostas obtidas pelo PCR multiplex e ensaios enzimáticos e confirmaram que a expressão dos genes detectados pela PCR foi confirmada em todos os casos nos ensaios

imunoenzimáticos, demonstrando a confiabilidade do teste molecular (Martinez-Blanch et al., 2009; Fernandez-No et al., 2011).

Os autores Jeßberger et al. (2015) avaliaram a sequência dos genes produtores de toxinas, transcrição, secreção de toxinas e citotoxicidade de isolados de *B. cereus sensu stricto* (s.s.), e observaram que a transcrição dos *nheB* e *hblD* e a titulação das proteínas NHE e HBL apresentaram diferenças em relação às cepas, a transcrição dos genes e a quantidade de proteína detectada, concluindo que a produção de toxinas é mais complexa do que o imaginado, podendo envolver diversos fatores, como proteínas reguladoras da transcrição, mecanismos pós-transcrição e pós-tradução (que afetam a estabilidade do RNAm, durabilidade da proteína ou resistência à proteases), além da influência de fatores ambientais, envolvendo principalmente a nutrição do organismo em questão, que poderá aumentar ou reduzir a sua expressão gênica de acordo com a maior ou menor oferta de nutrientes, respectivamente.

A análise da expressão gênica tem amplo uso e elevada importância na compreensão do metabolismo e sinalização dos processos celulares, sendo a qPCR considerada como o melhor método para avaliar mudanças no perfil de expressão gênica, devido à sua elevada sensibilidade, especificidade e capacidade de detecção de baixas concentrações de material genético (Artico et al., 2010; Die et al., 2010; Chen et al., 2011).

2.4. *B. cereus* e saúde pública

O *Bacillus cereus sensu stricto* (s.s.) é considerado a espécie de maior importância dentro do grupo em relação à saúde pública, devido à sua capacidade de produção de toxinas gastroentéricas que causam as síndromes emética e diarreica (Quinn et al., 2005; Maziero e Bersot, 2011). Tem temperatura ótima de multiplicação entre 28 e 35°C, sendo relatada sua multiplicação a 4°C e 48°C, e em pH entre 4,9 e 9,3, podendo ser isolado em diversos alimentos (Notermans e Batt, 1998). Há relatos em todo o mundo de surtos relacionados à ingestão de alimentos contaminados com esporos de *B. cereus* (Bennett et al., 2013; Messelhäusser et al.,

2014), como carnes, ovos, arroz, sanduíches, sopas, molhos, saladas, pizzas, peixes e derivados lácteos (Bennett et al., 2013; Ilha, 2014; Nascimento, 2013).

Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs) geralmente são subnotificados e a etiologia é definida baseando-se no período de incubação, sintomas, duração e alimentos contaminados (Bennett et al., 2013). No período de 1998 a 2006, estima-se que cerca de 19% dos casos de surtos de DTA nos Estados Unidos foram causados por *B. cereus* e este número pode ser ainda maior, tendo em vista que apenas 39% dos surtos tiveram sua etiologia confirmada (Bennett et al., 2013) e que os sintomas possuem curto período de duração, sendo subnotificados (Messelh usser et al., 2014). Em 2011, a *European Food Safety Authority* (EFSA) reportou um aumento de 122% no número de intoxica es e toxiinfec es causadas pelo *B. cereus* na Europa, estimando-se cerca de 4 casos para cada 1000 habitantes (EFSA, 2013).

H  relatos em literatura do isolamento de *B. cereus* em uma ampla variedade de alimentos processados e *in natura*, como arroz e massas, produtos infantis, vegetais, pimentas, alimentos prontos, leite e derivados (Maziero e Bersot, 2011; Chaves et al., 2011). Meer et al. (1991) relatou que 95% dos esporos são ativados após o processo de pasteuriza o, uma vez que a temperatura ótima de ativa o   de 65 a 75 C, que encontram ali condi es favoráveis para sua multiplica o e sobrevivência mesmo durante a refrigera o (Guinebreti re et al., 2008; Zhou et al., 2010). Lepsanovic et al. (2018) afirmou que o *B. cereus* esporula após o tratamento térmico como forma de defesa, o que permite a sua persistência no leite pasteurizado e demais derivados tratados termicamente.

Esta combina o das características termod rica e psicrotr fica em uma espécie denota o seu grande potencial deteriorante, uma vez que ela pode resistir aos tratamentos utilizados na indústria de alimentos, e ainda assim produzir enzimas que irão afetar a qualidade do leite e derivados e toxinas, que representam um grande problema para a saúde pública (Meer et al., 1991; Maziero e Bersot, 2011).

A síndrome emética   causada pela ingestão de alimentos previamente contaminados com a toxina termoestável "cereulide", que atua unindo-se aos

receptores de serotonina, estimulando o nervo vago aferente (Portuondo, 2012). O período de incubação é de 1 a 5 horas e os principais sintomas são náuseas agudas e vômitos (Fonseca, 2016; Portuondo, 2012). De acordo com Kotiranta et al (2000) e Agata et al. (1995), a produção da toxina ocorre na fase estacionária de multiplicação do microrganismo e se acumula ao longo do tempo nos alimentos. Entretanto, o risco da síndrome emética não pode ser previsto apenas pela quantificação de células viáveis nos alimentos, uma vez que diversos fatores influenciam na produção da toxina cereulide (Dommel et al., 2011).

Ehling-Schulz et al. (2004) descreveram a produção da toxina emética como sendo maior em cepas mesofílicas e a toxina diarreica em cepas psicotróficas, as quais estão mais relacionadas com o fluxograma de processamento de derivados lácteos, demonstrando o maior risco da ocorrência dessa segunda síndrome devido ao consumo de lácteos (Mckillip, 2000).

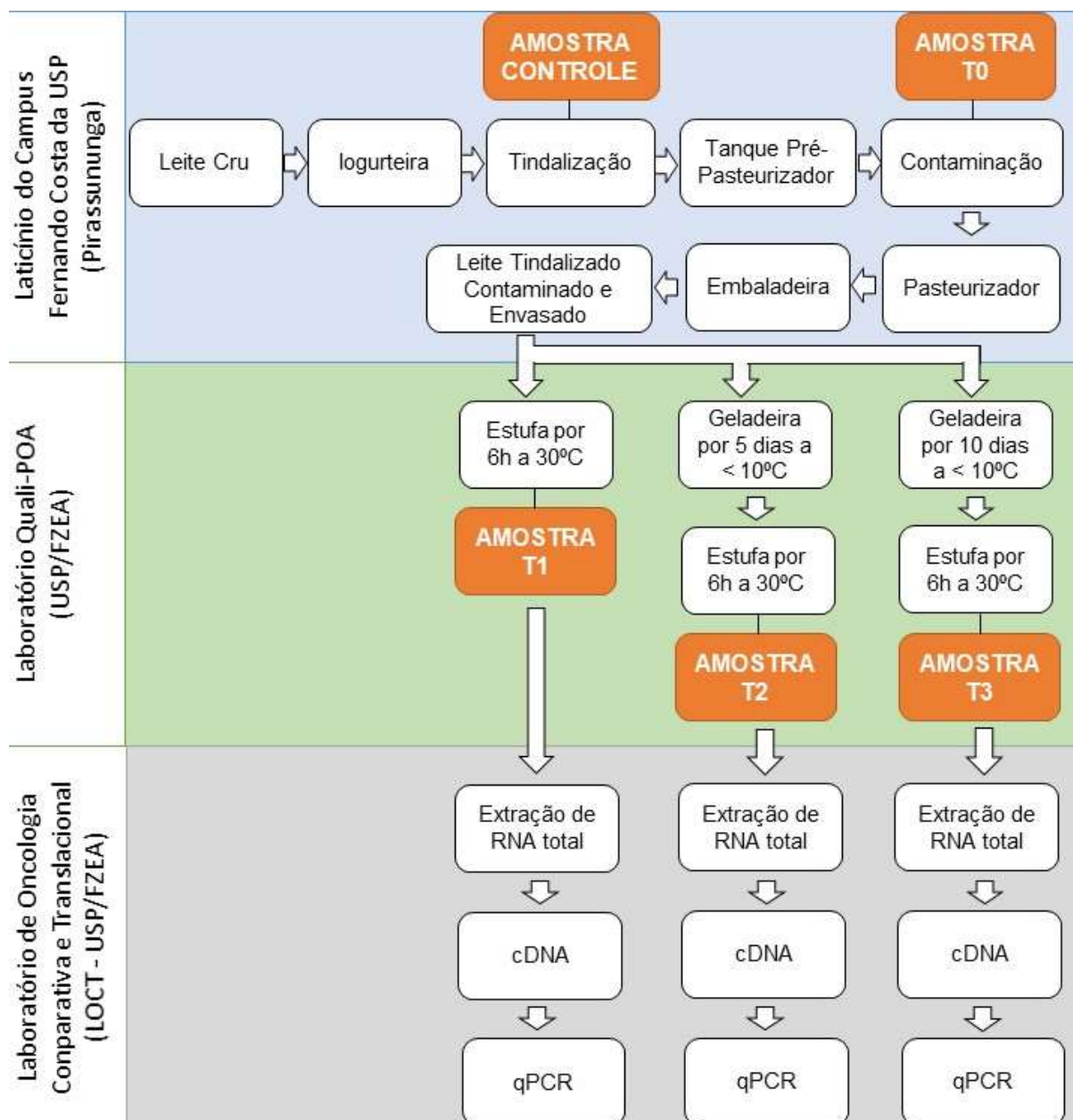
A presença de *B. cereus* foi relatada em leite *in natura*, pasteurizado, UAT, leite em pó, leites fermentados e outros derivados lácteos em diversos países (Wong et al., 1988; Vidal-Martins et al., 2005; Rezende-Lago et al., 2007; Zhou et al., 2008). Wong et al. (1988) detectaram *B. cereus* em 29% das amostras de leite em pó, 17% em leite fermentado, e 2% em leite pasteurizado. Zhou et al. (2010) detectaram a sua presença em 60% dos sorvetes comercializados na China. No Brasil, Vidal-Martins et al. (2005) detectaram microrganismos do grupo do *B. cereus* em 33,3% das amostras de leite cru, 21,8% de leite pasteurizado e 88,9% de leite UAT. Todos estes trabalhos enfatizam a importância da qualidade da matéria-prima utilizada na obtenção do leite e seus derivados, tendo em vista que o microrganismo, quando presente no produto ou planta industrial, dificilmente será removido através dos meios tradicionais de tratamento térmico e higienização/sanitização devido à sua elevada resistência e alto poder de adesão ao aço inoxidável (Chmielewski e Frank, 2003).

Tendo em vista a resistência a condições adversas, o potencial de produção de toxinas diarreicas, proteases e formação de biofilme pelo *B. cereus* s.s., cujo padrão de expressão de genes relacionados a estes fatores não é bem elucidado em literatura após o estresse térmico, este estudo objetivou verificar se a

pasteurização foi capaz de influenciar na expressão de genes relacionados à produção de toxinas diarreicas, metaloproteínase e formação de biofilme em leite contaminado experimentalmente com isolado de *B. cereus* s.s. ao longo da *shelf-life*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Figura 3. Fluxograma das etapas de realização deste trabalho, elucidando em qual instituição cada uma foi realizada.



3.1. Obtenção do Leite Tindalizado

Para produção de leite tindalizado foi utilizada uma iogurteira industrial (iogurteira Mec Milk®, Marca, País) com controle de temperatura, pertencente ao laticínio da Prefeitura do Campus USP “Fernando Costa” em Pirassununga – PUSP-P. Inicialmente esta foi submetida a limpeza mecânica, seguida de higienização com hidróxido de sódio, ácido nítrico e ácido peracético 0,05% a 25°C por 1 hora. Com o auxílio de suabes, foi realizada amostragem da superfície interna do equipamento para controlar a eficiência do processo de higienização. O procedimento de higienização foi aplicado também à tubulação e ao tanque de recepção de leite cru antes do pasteurizador.

A tindalização se deu aquecendo o leite a 80°C por 10 minutos, seguido por resfriamento até 30°C mantendo-o por 30 minutos para induzir a germinação bacteriana, finalizando após um novo aquecimento a 95°C por 20 minutos. O processo de tindalização se completava após 3 repetições de todo o ciclo descrito, conforme Kim et al. (2012) com adaptações.

Foram tindalizados 30L de leite cru, que ao final do processo, eram bombeados pela tubulação até o tanque de recepção de leite cru antes do pasteurizador. Destes, 10L foram pasteurizados e envasados em embalagens de polietileno com capacidade de 1L. Posteriormente, o Leite Tindalizado (LT – Controle Negativo) era transportado ao laboratório e mantido em refrigeração até o momento das análises seguintes. O experimento foi realizado em 3 repetições.

3.2. Contaminação experimental

Para a contaminação experimental do leite foram produzidos, sob as mesmas condições, três inóculos contendo células vegetativas de um isolado de *B. cereus* s.s. previamente sequenciado (SAMN07414939 – BioProject PRJNA390851) e que possui os genes de interesse necessários a este estudo (Rossi et al., 2018). O isolado mantido em estoque foi reativado em caldo infusão cérebro-coração (BHI), transferindo-se 10µL da cultura para 5 mL de caldo BHI e incubado a 30°C por 12 horas. No momento do uso, alíquotas das culturas foram submetidas a contagem populacional em placas com ágar manitol gema de ovo polimixina B (MYP) (Mossel

et al., 1967). As placas foram incubadas a 30°C por 24 horas e, ao final do período, foram observadas as colônias e consideradas sugestivas das bactérias do grupo do *B. cereus* aquelas que se apresentassem róseas, de aspecto rugoso e seco, medindo entre 3 e 6 mm de diâmetro, rodeadas por um halo esbranquiçado formado pela ação da lecitinase (Stadhouders, 1992).

Após a tindalização, supracitada, 10L de leite foram bombeados ao tanque de recepção de leite cru antes do pasteurizador, onde eram vertidos 15 mL de inóculo de células vegetativas de *B. cereus* s.s. ao leite (aproximadamente 10^8 UFC.mL⁻¹). Logo após a contaminação, eram coletados 50 mL de leite em frascos estéreis tipo Falcon (LTC – T0), que seguiam imediatamente para o Laboratório para extração de RNA e contagem populacional.

O leite restante era então homogeneizado, pasteurizado e envasado (leite contaminado pasteurizado - LCP – T0), sendo em seguida transportado, sob refrigeração, ao Laboratório Quali-POA e submetido a contagem populacional, que deveria apresentar uma população de aproximadamente 10^3 UFC.mL⁻¹. Para a análise de expressão gênica e isolamento microbiológico durante a *shelf-life*, as amostras de LCP tiveram que ser incubadas por 6 horas a 30°C, pois este binômio é considerado adequado para a germinação dos esporos do *B. cereus* s.s.. Vale ressaltar que inicialmente tentou-se verificar a expressão dos genes sem incubar as amostras, e todos os resultados foram negativos.

As amostras de leite pasteurizado previamente contaminado (LCP) foram armazenadas sob refrigeração (7°C), sendo a primeira análise realizada no dia da pasteurização (LCP – T1), a segunda após 5 dias de armazenamento (LCP – T2) e a terceira após 10 dias de armazenamento (LCP – T3) sendo todas previamente incubadas a 30°C por 6 horas, e posteriormente foi realizado o isolamento em placas com ágar manitol gema de ovo polimixina B (MYP) (30°C por 24 horas) (Mossel et al., 1967) e a qPCR.

3.3. Análise de expressão gênica por PCR em tempo real

As amostras LT, LTC (T0) e LCP (T1, T2 e T3) foram transportadas ao Laboratório de Oncologia Comparada e Translacional (LOCT-USP), onde foram realizadas as etapas de análises de biologia molecular.

A extração de RNA foi realizada através do kit comercial TRIzol® Max™ Bacterial RNA Isolation Kit (ThermoFisher Scientific™) com algumas alterações no protocolo. Inicialmente, adicionamos 2 mL da amostra em microtubos que seguiram para a centrífuga a 25°C, 10.000g por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuscitado em 2 mL de solução fisiológica (NaCl 0,9%) e homogeneizado, retornando novamente para a centrífuga a 25°C, 10.000g por 3 minutos. Este processo foi repetido três vezes para descartar o máximo de leite, gordura e sólidos possíveis, mantendo apenas as células vegetativas de *B. cereus* s.s. no *pellet*. Em seguida, foram adicionados 200 µL de TRIzol® Max™ Bacterial pré-aquecido a 95°C por 5 minutos e a mistura foi incubada em banho-maria a 95°C por 4 minutos. Foi adicionado então 1 mL do reagente TRIzol® e o restante do protocolo seguiu de acordo com as instruções do fabricante.

O RNA extraído foi quantificado através de espectrofotometria (NanoDrop™ 2000 Spectrophotometer ThermoFisher Scientific™, EUA) e sua integridade foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 2%. Em seguida, o RNA foi tratado com DNase I (RNase-free – Life Technologies™), para remoção de possíveis vestígios de DNA na amostra, e padronizado de modo que todas amostras estivessem na concentração de 200 ng de RNA em 25 µL de reação.

A transcrição reversa para obtenção de cDNA foi realizada utilizando o *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems™), de acordo com instruções do fabricante.

A seleção de *primers* para as reações de PCR foi realizada utilizando a sequência dos genes alvo desse estudo (*hblA*, *hblC*, *hblD*, *nheA*, *nheB*, *nheC*, *cytk*, *npr* e *plcr*) determinada pelo sequenciamento do genoma completo do isolado (*Isolate* SAMN07414939 – BioProject PRJNA390851). Para elaboração dos *primers*, foi utilizada a ferramenta online Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), na qual foi inserida a sequência já conhecida dos genes de interesse. Os *primers* foram testados na ferramenta Primer-BLAST para especificidade e condições desejadas, foi visualizado através da ferramenta online NCBI sequence viewer (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/sviewer/>). Os *primers* e condições utilizados encontram-se descritos na tabela 1.

Tabela 1. Genes selecionados, *Primers* desenhados e condições utilizadas no estudo.

Genes	Primers (5'-3')	Produto (bp)
<i>16S_f</i>	TGATGAAGGCTTTCGGGTCG	139
<i>16S_r</i>	TGCCACCTACGTATTACCGC	139
<i>hblA_f</i>	GAACAAATGCGCCAAATGCG	82
<i>hblA_r</i>	TTAGCCCCTCCACTCCACAT	82
<i>hblC_f</i>	GCAACACCAATCGTTCAAGC	150
<i>hblC_r</i>	AGCTGGGACTTCCTCTAGCTG	150
<i>hblD_f</i>	TCAATTGGTGGTGGATTGGGA	134
<i>hblD_r</i>	ATACCAGCTGCGCCAAGAG	134
<i>nheA_f</i>	CCGCTTATTCAAGCATAACGGA	111
<i>nheA_r</i>	CTCTCGTACATTCGCCTTTGC	111
<i>nheB_f</i>	TAGTTATTGCTACGGGCGCA	89
<i>nheB_r</i>	GATACCAGCTGTACCACCGC	89
<i>nheC_f</i>	TGGCGTACTTTGCGTAGCTC	139
<i>nheC_r</i>	TACGACTTCTGCTTGTGCTCC	139
<i>cytk_f</i>	CTGCTGCTTACGCTCAAACG	148
<i>cytk_r</i>	GCGCTCGGATCATCGATAAAAAG	148
<i>npr_f</i>	TGTTAGCGACAGGAATGGCA	142
<i>npr_r</i>	GTCGCTCCAGTTAGATCACCA	142
<i>plcr_f</i>	CCCGATTCAATTCTGCTCAC	118
<i>plcr_r</i>	TGCACGCAGAGAAATTAGGA	118

As reações de PCR em tempo real foram realizadas utilizando SYBR GREEN (Fast SYBR™ Green Master Mix – ThermoFisher Scientific™) para detecção dos diferentes produtos de PCR em equipamento StepOne™ *Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, EUA). As condições para a qPCR encontram-se na Tabela 2, seguindo instruções do próprio fabricante.

Tabela 2. Condições do qPCR utilizando equipamento StepOne™ *Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, EUA) e reagente Fast SYBR™ Green Master Mix – ThermoFisher Scientific™.

	Temperatura	Duração	Ciclos
Ativação da DNA polimerase	95°C	20 segundos	1
Desnaturação	95°C	3 segundos	40
Anelamento/Extensão	60°C	30 segundos	40

O gene 16S foi selecionado como controle endógeno de amplificação (Schmittgen e Zakrajsek, 2000) e a análise de expressão relativa seguiu o método de Pfaffl (2001). A eficiência de cada par de primers encontra-se disposta na Tabela 3.

Tabela 3. Eficiência dos primers utilizados no estudo.

Primers	Eficiência
<i>16s</i>	87%
<i>plcr</i>	107%
<i>hblA</i>	86%
<i>hblC</i>	102%
<i>hblD</i>	99%
<i>nheA</i>	100%
<i>nheB</i>	102%
<i>nheC</i>	109%
<i>cytk</i>	89,8%
<i>npr</i>	117%

3.4. *Análise estatística*

Para determinar a diferença estatisticamente significativa entre a expressão gênica nos diferentes momentos, os dados das amostras LCP – T1, T2 e T3 foram analisados de acordo com o método de Pfaffl (2001). Como os dados obtidos no RT-qPCR não apresentaram distribuição normal, o teste de Kruskal-Wallis (Prism®G 6.01 - GraphPad Software, EUA) foi utilizado para analisar os dados não-paramétricos com significância estabelecida a $P < 0.05$. A remoção dos valores considerados outliers foi realizada baseando-se nos valores que estivessem fora do intervalo de “média \pm 2.Desvio Padrão”. Para a comparação entre os genes foi realizado o Teste de Correlação de Spearman para dados não paramétricos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Por meio do isolamento em placas, foi verificada a presença do *B. cereus* s.s. nas amostras de LTC (T0) e LCP (T0, T1, T2 e T3) e nas amostras de LT foi verificada a sua ausência. As amostras de LCP – T0 não apresentaram valores de expressão gênica, uma vez que as células vegetativas de *B. cereus* s.s. inoculadas no LT sofreram o estresse térmico da pasteurização e esporularam, não apresentando expressão gênica. Os valores de razão de expressão dos genes nas mostras LCP – T1, T2 e T3 encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4. Valores de razão da expressão gênica de *B. cereus* s.s. para os genes *plcr*, *hblA*, *hblC*, *hblD*, *nheA*, *nheB*, *nheC*, *cytk* e *npr* presentes em amostras de LCP – T1, T2 e T3 antes da remoção dos valores considerados *outliers*.

Gene	LCP	T1	T2	T3
<i>plcr</i>	R1	1,55241	0,582143	1,223606
	R2	3,207527	0,268833	1,053682
	R3	2,849358	5,029712	0,486359
<i>hblA</i>	R1	0,939186	0,474489	0,38832
	R2	0,533805	0,375395	0,977354
	R3	0,729643	2,853444	0,800649
<i>hblC</i>	R1	5,144872	0,117693	0,224887
	R2	2,307846	0,156727	0,42591
	R3	3,41693	0,812936	0,163565
<i>hblD</i>	R1	8,520723	0,289106	0,261444
	R2	3,762713	0,189831	0,518324
	R3	6,555188	2,49854	0,293682
<i>nheA</i>	R1	1,221791	0,087625	0,283265
	R2	2,443954	0,057073	0,159877
	R3	3,97138	0,915352	0,138658
<i>nheB</i>	R1	1,185627	0,101984	0,051721
	R2	1,204762	0,042945	0,077206
	R3	1,659005	0,692088	0,069527
<i>nheC</i>	R1	1,220115	0,266468	0,176286
	R2	2,656907	0,16728	0,17652
	R3	6,202661	1,422022	0,275619
<i>cytk</i>	R1	1,923711	0,130515	0,817617
	R2	4,462812	0,074808	0,224031
	R3	5,817307	3,304969	0,136726
<i>npr</i>	R1	1,574447	0,309869	0,098105
	R2	5,172252	0,232935	0,456722
	R3	4,844933	1,559528	0,243428

LCP – T1 – leite contaminado e pasteurizado após 6 horas de incubação; LCP – T2 – leite contaminado e pasteurizado após 5 dias de armazenamento sob refrigeração e 6 horas de incubação;

T3 – leite contaminado e pasteurizado após 10 dias de armazenamento sob refrigeração e 6 horas de incubação; R1 – primeira repetição; R2 – segunda repetição; R3 – terceira repetição do experimento.

As médias das razões da expressão dos genes *plcr*, *hblA*, *hblC*, *hblD*, *nheA*, *nheB*, *nheC*, *cytk* e *npr* por *Bacillus cereus* s.s. verificada em amostras de leite tinalizado e contaminado (LTC – T0) e em leite contaminado e pasteurizado, logo após a pasteurização (LCP – T1) e ao longo da *shelf-life* do leite pasteurizado (LCP – T2 e T3) estão apresentadas na Tabela 5, após a remoção dos valores *outliers*.

Tabela 5. Médias e desvio padrão da razão da expressão gênica de *B. cereus* s.s. para os genes *plcr*, *hblA*, *hblC*, *hblD*, *nheA*, *nheB*, *nheC*, *cytk* e *npr* presentes em amostras de LCP – T1, T2 e T3 e a análise estatística (Valor-*p* de acordo com o teste de Kruskal-Wallis).

Gene		LCP			Valor- <i>p</i>
		T1	T2	T3	
<i>Plcr</i>	Média	2,537	0,425	0,920	0,0250
	Desvio Padrão	0,713	0,155	0,312	
<i>hblA</i>	Média	0,733	0,425	0,723	0,3071
	Desvio Padrão	0,167	0,045	0,247	
<i>hblC</i>	Média	2,865	0,363	0,270	0,1286
	Desvio Padrão	0,555	0,316	0,116	
<i>hblD</i>	Média	6,280	0,993	0,357	0,0571
	Desvio Padrão	1,953	1,066	0,116	
<i>nheA</i>	Média	2,543	0,357	0,193	0,0500
	Desvio Padrão	1,125	0,399	0,062	
<i>nheB</i>	Média	1,350	0,277	0,067	0,0500
	Desvio Padrão	0,219	0,293	0,012	
<i>nheC</i>	Média	1,940	0,620	0,213	0,2786
	Desvio Padrão	0,720	0,567	0,047	
<i>cytk</i>	Média	3,190	1,167	0,393	0,2857
	Desvio Padrão	1,270	1,509	0,303	
<i>Npr</i>	Média	3,860	0,700	0,267	0,0500
	Desvio Padrão	1,625	0,609	0,148	

LCP – T1 – leite contaminado e pasteurizado após 6 horas de incubação; LCP – T2 – leite contaminado e pasteurizado após 5 dias de armazenamento sob refrigeração e 6 horas de incubação; T3 – leite contaminado e pasteurizado após 10 dias de armazenamento sob refrigeração e 6 horas de incubação.

A avaliação da expressão dos genes *plcr*, *hblA*, *hblC*, *hblD*, *nheA*, *nheB*, *nheC*, *cytk* e *npr* por *Bacillus cereus* s.s. nas amostras LTC – T0 foi realizada apenas para constatar que estes genes estavam sendo expressos após a inoculação do *B. cereus* s.s. no leite, como um controle positivo, sendo assim, tais resultados não serão utilizados para fins comparativos entre as análises estatísticas.

Porém, é importante salientar, que após a pasteurização as razões de expressão de todos os genes pesquisados foram maiores, tal fato pode ser justificado, pois alterações na temperatura geram mudanças nas membranas celulares: a célula detecta essas alterações como um sinal e o transmite aos seus mecanismos reguladores que, direta ou indiretamente, interagem com regiões regulatórias de genes que codificam proteínas, ativando-as e levando a uma maior expressão gênica das mesmas (Ribeiro, 2010).

Como apresentado nas tabelas 4 e 5, o gene *plcr* foi expresso ao longo de toda a *shelf-life* do leite pasteurizado, sendo a média das razões de expressão em LCP – T1 (2,537) maior do que nos momentos T2 (0,425) e T3 (0,920). Os números apresentados indicaram uma redução na expressão e diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) entre as expressões nos momentos LCP - T1, T2 e T3; no entanto, no Teste de Comparação Múltipla de Dunn, não foi observada diferença estatisticamente significativa, negando a hipótese de que houve uma diferença entre os momentos.

Agaisse et al. (1999) relataram que o *plcr*, como gene regulatório, é responsável por controlar a expressão de genes que encodam fatores de virulência e proteínas de superfície, como a pPRP13, que atua inibindo a resposta humoral do hospedeiro, facilitando os processos toxiinfeciosos causados pelo *B. cereus* s.s. De acordo com os resultados, observa-se que esta bactéria manteve a capacidade de produção de biofilme, esporulação e produção de toxinas gastroentericas ao longo da *shelf-life* do leite pasteurizado da mesma maneira, sem impacto significativo sobre os seus mecanismos regulatórios. Isso denota o risco potencial que o *Bacillus cereus* s.s. representa à saúde pública e à indústria de laticínios, uma vez que

mesmo após um estresse térmico ele mantém seus mecanismos de regulação e fatores de virulência como resposta a elementos ambientais, conforme sugerido por Gohar et al. (2008), em uma tentativa de sobrevivência no ambiente e em um possível hospedeiro.

As médias das razões da expressão gênica de *hblA*, *hblC*, *hblD*, *nheA*, *nheB*, *nheC*, *cytk* e *npr* não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$) entre os momentos avaliados (T1, T2 e T3) no teste de Kruskal-Wallis.

Os resultados encontrados neste estudo demonstram que, mesmo após a pasteurização, o *B. cereus* s.s. mantém sua capacidade de produzir proteínas do complexo HBL, como pode ser observado nas Tabelas 4 e 5, onde houve expressão gênica em todas as amostras ao longo da *shelf-life*. No entanto, a expressão do gene *hblA* foi muito semelhante nos momentos T1 e T3, com uma redução no T2, sendo assim ela diminuiu e aumentou novamente ao longo da *shelf-life* do leite pasteurizado. Em relação às médias das razões da expressão de *hblC* e *hblD* foi reduzida ao longo da *shelf-life*. No momento T3 a expressão dos três genes é reduzida quando comparada com os momentos T1 e T2.

O fato dos 3 genes do complexo *hbl* estarem sendo expressos, demonstra um risco para saúde pública, pois segundo Hansen e Hendriksen (2001), há necessidade da presença das 3 frações para formar o complexo proteico funcional e efetivamente patogênico. No teste de Correlação de Spearman, a correlação entre a expressão dos genes do complexo *hbl* foi de 72,64% entre *hblA* e *hblC*, 55,17% entre *hblA* e *hblD* e 23,85% entre *hblC* e *hblD*. Esperava-se que estes valores de correlação fossem mais elevados, tendo em vista que os três genes encontram-se no mesmo operon (Schoeni and Wong, 2005) e, teoricamente, são traduzidos em sequência.

Tais resultados realçam para a importância de uma matéria-prima de qualidade e para boas práticas de higiene dentro das plantas de laticínios. Uma vez contaminado o leite, a pasteurização não irá inativar o *B. cereus* s.s. nem impactar à sua produção de toxinas gastroentéricas que colocam em risco a saúde dos consumidores, que podem se intoxicar com um alimento até então considerado “seguro” para o consumo (Bennett et al., 2013; Ilha, 2014; Nascimento, 2013).

Os resultados também demonstraram que o *B. cereus* s.s. manteve sua expressão gênica no complexo *nhe* (*nheA*, *nheB* e *nheC*) ao longo da *shelf-life* do leite pasteurizado (tabelas 4 e 5), com algumas semelhanças entre a expressão nos diferentes momentos: em T1 a expressão dos três genes foi maior (*nheA* 2,543, *nheB* 1,350 e *nheC* 1,940), reduzindo em T2 (*nheA* 0,357, *nheB* 0,277 e *nheC* 0,620) e T3 (*nheA* 0,193, *nheB* 0,067 e *nheC* 0,213). A correlação entre as médias das expressões dos genes foi de 0,08% entre *nheA* e *nheB*, 1,2% entre *nheA* e *nheC* e 0,2% entre *nheB* e *nheC*, valores considerados extremamente baixos, uma vez que todos os genes localizam-se no mesmo operon. Segundo Lindbäck et al. (2004) é necessária que a razão entre os três componentes seja de 10:10:2 para que ocorra a máxima ação citotóxica. Assim, o *B. cereus* s.s. manteve seu potencial de produção da toxina, que mesmo não estando no seu máximo potencial citotóxico, ainda representa riscos à saúde pública. Jeßberger et al. (2015) afirmou que a expressão gênica de *B. cereus* s.s. é extremamente complexa e depende de fatores transcricionais, pós-transcricionais, translacionais e pós-translacionais.

Outro fator importante para a síndrome diarreica é a Citotoxina K (Ngamwongsatit et al., 2008), codificada pelo gene *cytk*, que foi expresso ao longo de toda a *shelf-life* do leite pasteurizado contaminado. Apesar de ter sido verificada a diminuição das médias das razões da expressão do gene *cytk* ao longo da *shelf-life* do leite pasteurizado, não houve diferença estatisticamente significativa, o que denota a capacidade de produção constante deste gene. Tal fato torna-se ainda mais importante tendo em vista que segundo Ngamwongsatit et al. (2008), a citotoxina K é considerada um fator primário para a ocorrência da síndrome diarreica causada pelo *B. cereus*.

A expressão do gene *npr* ao longo da *shelf-life* do leite pasteurizado também foi verificada e esta apresentada nas tabelas 4 e 5, onde assim como nos demais genes houve uma diminuição ao longo do tempo. Isto indica que após 10 dias, sob refrigeração, em condições adequadas, os produtos inicialmente contaminados com *B. cereus* s.s. ainda podem apresentar reações proteolíticas, podendo gerar alterações no sabor e consistência do produtos, segundo Kumari e Sarkar (2016).

O isolado de *B. cereus* s.s. (SAMN07414939 – BioProject PRJNA390851) utilizado na contaminação experimental é um mesófilo e a pasteurização seguida de

refrigeração por período prolongado pode ter impactado sua fisiologia, reduzindo assim a expressão dos genes pesquisados ao longo da *shelf-life*, mesmo que não tenham sido considerado estatisticamente diferentes.

Assim, alerta-se para importância da manutenção da cadeia do frio, pois quando os produtos refrigerados são mantidos em temperatura ambiente (aproximadamente 30°C), mesmo que por curtos períodos, podem possibilitar a germinação de esporos e posteriormente a expressão de genes indesejados, colocando em risco a saúde do consumidor e a possível deterioração dos produtos.

CONCLUSÃO

A expressão dos genes *hblA*, *hblC*, *hblD*, *nheA*, *nheB*, *nheC*, *cytk* e *npr* manteve-se ao longo da *shelf-life* de maneira similar, denotando que mesmo após o tratamento térmico aplicado ao leite contaminado com *B. cereus* s.s. este persistiu com seu potencial de causar síndrome diarreica, formar biofilme e produzir protease.

REFERÊNCIAS

Agaisse H, Gominet M, Okstad OA, Kolsto AB, Lereclus D. (1999) PlcR is a pleiotropic regulator of extracellular virulence factor gene expression in *Bacillus thuringiensis*. **Molecular Microbiology** 32:1043-1053.

Agata N, Ohta M, Mori M, Isabe M. (1995) A novel dodecadepsipeptide, cereulide, isanemetic toxin of *Bacillus cereus*. **FEMS Microbiol Letters** 129:17-20.

Andersson A, Ronner U, Granum PE. (1995) What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*? **International Journal of Food Microbiology** 28:145-155.

Artico S, Nardeli SM, Brilhante O, Sa MFG, Ferreira MA. (2010) Identification and evaluation of new reference genes in *Gossypium hirsutum* for accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data. **BMC Plant Biology** 10:1-9.

Bach H-J, Errampalli D, Leung KT, Hartmann A, Trevors JT, Munch JC. (1999) Specific detection of the gene for the extracellular neutral protease of *Bacillus cereus* by PCR and blot hybridization. **Applied and Environmental Microbiology** 65:3226–3228.

Barach JT, Anams DM, Speck ML. (1976) Stabilization of a psychrotrophic *Pseudomonas* protease by calcium against thermal inactivation in milk at ultrahigh temperature. **Applied and Environmental Microbiology** 31:875-879.

Beecher DJ, Schoeni JL, Wong AC. (1995) Enterotoxic activity of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. **Infection and Immunity** 63:4423-4428.

Bennet SD, Walsh KA, Gould LH. (2013) Foodborne disease outbreaks caused by *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, and *Staphylococcus aureus* — United States, 1998–2008. **Clinical Infectious Diseases** 57:425-433.

Brown KL. (2000) Control of bacterial spores. **British Medical Bulletin** 56:158–171.

Cardoso RR. (2006) **Influência da microbiota psicrotrófica no rendimento de queijo minas frescal elaborado com leite estocado sob refrigeração**. 43 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – UFV, Viçosa.

Chaves JQ, Pires ES, Vivoni AM. (2011) Genetic diversity, antimicrobial resistance and toxigenic profiles of *Bacillus cereus* isolated from food in Brazil over three decades. **International Journal of Food Microbiology** 147:12-16.

Chen L, Zhong HY, Kuang JF, Li JG, Lu WJ, Chen JY. (2011) Validation of reference genes for RT-qPCR studies of gene expression in banana fruit under different experimental conditions. **Planta** 234:377–390.

Chmielewski RAN, Frank JF. (2003) Biofilm formation and control in food processing facilities. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety** 2:22-32.

Die JV, Román B, Nadal S, González-Verdejo CI. (2010) Evaluation of candidate reference genes for expression studies in *Pisum sativum* under different experimental conditions. **Planta** 232:145–153.

Domingues AS. (2011) **Biofilme de *Bacillus cereus* em superfície de aço inoxidável: ação bactericida e esporicida de óleos essenciais**. 150 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

Dommel ML, Lücking G, Scherer S, Ehling-Schulz M. (2011) Transcriptional kinetic analyses of cereulide synthetase genes with respect to growth, sporulation and emetic toxin production in *Bacillus cereus*. **Food Microbiology** 28:284-290.

EFSA. (2013) The European Union summary report on Trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2011. **EFSA Journal** 11:1-250.

Ehling-Schulz M, Fricker M, Scherer S. (2004) *Bacillus cereus*, the causative agent of an emetic type of food-borne illness. **Molecular Nutrition & Food Research** 48:479-487.

Elshaghabee FMF, Rokana N, Gulhane RD, Sharma C, Panwar H. (2017) *Bacillus* as potential probiotics: status, concerns, and future Perspectives. **Frontiers in Microbiology** 8:1490.

Fagerlund A, Ween O, Lund T, Hardy SP, Granum PE. (2004) Genetic and functional analysis of the CytK family of genes in *Bacillus cereus*. **Microbiology** 150:2689-2697.

FDA (2012) **The Bad Bug Book, Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins**, Ed. 2, 2012.

Fernández-No IC, Guarddon M, Böhme K, Cepeda A, Calo-Mata P, Barros-Velázquez J. (2011) Detección and quantification of spoilage and pathogenic *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* by real-time PCR. **Food Microbiology** 28:605-610.

Fonseca PHD. (2016) **Análise da expressão e produção de enterotoxinas e toxina emética de *Bacillus cereus***. 58 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Lisboa, Lisboa.

Furtado MM. (2005) **Principais problemas dos queijos: causas e prevenção**. Fonte comunicações e editora. São Paulo, 200p., 2005.

Gohar M, Faegri K, Perchat S, Ravnum S, Okstad OA, Gominet M, Kolsto AB, Lereclus D. (2008) The PlcR virulence regulon of *Bacillus cereus*. **PLoS One** 3:1-9.

Guinebretière MH, Thompson FL, et al. (2008) Ecological diversification in the *Bacillus cereus* group. **Environmental Microbiology** 10:851-865.

Hansen BM, Hendriksen NB. (2001) Detection of enterotoxic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis. **Applied and Environmental Microbiology** 67:185-189.

Hardy SP, Lund T, Granum PE. (2001) CytK toxin of *Bacillus cereus* forms pores in planar lipid bilayers and is cytotoxic to intestinal epithelia. **FEMS Microbiology Letters** 197:47-51.

Hayrapetyan H, Muller L, Tempelaars M, Abee T, Nierop GM. (2015) Comparative analysis of biofilm formation by *Bacillus cereus* reference strains and undomesticated food isolates and the effect of free iron. **International Journal of Food Microbiology** 200:72-79.

Helgason E, Tourasse NJ, Meisal R, Caugant DA, Kolstø AB. (2004) Multilocus sequence typing scheme for bacteria of the *Bacillus cereus* group. **Applied and Environmental Microbiology** 70:191-201.

Hsueh YH, Somers EB, Lereclus D, Wong ACL. (2006) Biofilm formation by *Bacillus cereus* is influenced by PlcR, a pleiotropic regulator. **Applied and Environmental Microbiology** 72:5089-5092.

Ilha F. (2014) **PepsiCo confirma que lote de Toddynho está contaminado com bactéria**. O GLOBO, Rio de Janeiro, 12 ago. 2014. Economia. Disponível em: <<http://oglobo.globo.com/economia/defesado-consumidor/pepsico-confirma-que-lote-de-toddynho-esta-contaminado-combacteria> 13576454>. Acesso em: 15 fev. 2017.

Janstová B, Dracková M, Varlová L. (2006) Effect of *Bacillus cereus* enzymes on the milk quality following ultrahigh temperature processing. **Acta Veterinae Brno** 75: 601-609.

Jay JM, Loessner MJ, Golden DA. (2005) **Modern food microbiology**. New York: Springer, 2005.

Jeßberger N, Krey VM, Rademacher C, Bohm M-E, Mohr A-K, Ehling-Schulz M, Scherer S, Martlbauer E. (2015) From genome to toxicity: a combinatory approach highlights the complexity of enterotoxin production in *Bacillus cereus*. **Frontiers in Microbiology** 6:560-565.

Jonghe VD, Coorevits A, De Block J, Van Coillie E, Grijspeerdt K, Herman L, De Vos P, Heyndrickx M. (2010) Toxicogenic and spoilage potential of aerobic spore-formers isolated from raw milk. **International Journal of Food Microbiology** 136:318-325.

Jung MY, Paek WK, Park IS, Han JR, Sin Y, Paek J, Rhee MS, Kim H, Song HS, Chang YH. (2010) *Bacillus gaemokensis* sp. nov. isolated from foreshore tidal flat sediment from the Yellow Sea. **The Journal of Microbiology** 48:867-871.

Jung MY, Kim JS, Paek WK, Lim J, Lee H, Kim PI, Ma JY, Kim W, Chang YH. (2011) *Bacillus manliponensis* sp. nov. a new member of the *Bacillus cereus* group isolated from foreshore tidal flat sediment. **The Journal of Microbiology** 49:1027-1032.

Kim H, Kim H, Bang J, Kim Y, Beuchat LR, Ryu JH. (2012) Reduction of *Bacillus cereus* spores in sikhye, a traditional Korean rice beverage, by modified tyndallization processes with and without carbon dioxide injection. **Letters in Applied Microbiology** 55:218-223.

Kolstø AB, Lereclus D. (2002) Two-dimensional electrophoresis analysis of the extracellular proteome of *Bacillus cereus* reveals the importance of the PlcR regulon. **Proteomics** 2:784-791.

Kotiranta A, Lounatmaa K, Haapasalo M. (2000) Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. **Microbes Infect** 2:189-98.

Kumari S, Sarkar P. (2016) *Bacillus cereus* hazard and control in industrial dairy processing environment. **Food Control** 69:20-29.

Lepsanovic Z, Djordjevic V, Lakicevic B, Savic D, Velebit B, Josic D, Karabasil N. (2018) Detection of toxin genes and randomly amplified polymorphic DNA typing of *Bacillus cereus* isolates from infant milk formulas. **Journal of Food Safety** 38:1-7.

Lindbäck T, Fagerlund A, Rodland MS, Granum PE. (2004) Characterization of the *Bacillus cereus* Nhe enterotoxin. **Microbiology** 150:3959-3967.

Liu B, Liu GH, Hu GP, Cetin S, Lin NQ, Tang JY, Tang WQ, Lin YZ. (2014) *Bacillus bingmayongensis* sp. nov., isolated from the pit soil of Emperor Qin's Terra-cotta warriors in China. **Antonie van Leeuwenhoek** 105:501-510.

Majed R, Faille C, Kallassy M, Gohar M. (2016) *Bacillus cereus* biofilms: same, only different. **Frontiers in Microbiology** 7:1-16.

Martínez-Blanch JF, Sánchez G, Garay E, Aznar R. (2009) Development of a real-time PCR assay for detection and quantification of enterotoxigenic members of *Bacillus cereus* group in food samples. **International Journal of Food Microbiology** 135:15-21.

Maziero MT, Bersot LS. (2013) *Bacillus cereus* em produtos lácteos - uma revisão. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes** 66:5-12.

Mckillip JL. (2000) Prevalence and expression of enterotoxins in *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp., a literature review. **Antonie van Leeuwenhoek** 77:393-399.

Meer RR, Baker J, Bodyfelt FW, Griffiths MW. (1991) Psychrotrophic *Bacillus* spp in fluid milk products: a review. **Journal of Food Protection** 54:969-979.

Messelhäusser U, Frenzel E, Blöching C, Zucler R, Kämpf P, Ehling-Schulz M. (2014) Emetic *Bacillus cereus* are more volatile than thought: recent foodborne outbreaks and prevalence studies in Bavaria (2007–2013). **BioMed Research International** 2014:1-9.

Miller RA, Beno SM, Kent DJ, Carroll LM, Martin NH, Boor KJ, Kovac J. (2016) *Bacillus wiedmannii* sp. nov. is a new psychrotolerant and cytotoxic *Bacillus cereus* group species isolated from dairy foods and environments in the USA. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 66:4744-4753.

Mitchell GE, Ewings KN. (1986) Physicochemical properties of proteinases from selected psychrotrophic bacteria. **Journal of Dairy Research** 53:97-115.

Mossel DAA, Koopman MJ, Jongerius E. (1967) Enumeration of *Bacillus cereus* in foods. **Applied Microbiology** 15:650-653.

Nascimento CB. (2013) **Surtos de toxinfecção alimentar notificados e investigados no Município de Porto Alegre no período de 2003 a 2011**. Monografia (Especialização em Produção, Higiene e Tecnologia de Produtos de Origem Animal). Porto Alegre.

Ngamwongsatit P, Buasri W, Pianariyanon P, Pulsrikarn C, Ohba M, Assavanig A, Panbangred W. (2008) Broad distribution of enterotoxin genes (hblCDA, nheABC, CytK, and entFM) among *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* as shown by novel primers. **International Journal of Food Microbiology** 121:352-356.

Notermans S, Batt CA. (1998) A risk assessment approach for food-borne *Bacillus cereus* and its toxins. **Journal of Applied Microbiology** 84:51S-61S.

Pasvolsky R, Zakin V, Ostrova I, Shemesh M. (2014) Butyric acid released during milk lipolysis triggers biofilm formation of *Bacillus* species. **International Journal of Food Microbiology** 181:19-27.

Patiño-Navarrete R, Sanchis V. (2017) Evolutionary processes and environmental factors underlying the genetic diversity and lifestyles of *Bacillus cereus* group bacteria. **Research in Microbiology** 168:309-318.

Pfaffl MW. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research** 29:2002-2007.

Portuondo IP. (2012) *Bacillus cereus* y su papel en las intoxicaciones alimentarias. **Revista Cubana de Salud Pública** 38:98-108.

Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJC, Leonard FC. (2005) **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. 1ª edição. Ed. Artmed.

Rezende-Lago NCM, Rossi Jr OD, Vidal-Martins AMC, Amaral LA. (2007) Occurrence of *Bacillus cereus* in whole milk and enterotoxigenic potential of the isolated strains. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia** 59:1563-1569.

Ribeiro CS. (2010) Thermal influence on gene expression regulation and its action in the dynamics of cell membranes. **Revista da Biologia** 4:6-12.

Rossi GAM, Silva HO, et al. (2018). Comparative genomic survey of *Bacillus cereus sensu stricto* isolates from the dairy production chain in Brazil. **FEMS Microbiology Letters** 365:1-9.

Samaržija D, Zamberlin S, Pogacic T. (2012) Psychrotrophic bacteria and milk and dairy products quality. **Mljekarstvo** 62:77-95.

Scarff JM, Raynor MJ, Seldina YI, Ventura CL, Koehler TM, O'Brien AD. (2016) The roles of AtxA orthologs in virulence of anthrax-like *B. cereus* G9241. **Molecular Microbiology** 102:545-561.

Schleifer K, Whitman WB. (2009) **Bergey's manual of systematic bacteriology: The Firmicutes**. 2nd ed. New York: Springer; 2009.

Schmittgen TD, Zakrajsek BA. (2000) Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods** 46:1-2.

Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, Zeigler DR, Hean DH. (1998) *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** 62:775-806.

Schoeni J, Lee Wong ACL. (2005) *Bacillus cereus* food poisoning and its toxins. **Journal of Food Protection** 68:636–648.

Silva HO, Lima JAS, Aguilar CEG, Rossi GAM, Mathias LA, Vidal AMC. (2018) Efficiency of different disinfectants on *Bacillus cereus* sensu stricto biofilms on stainless-steel surfaces in contact with milk. **Frontiers in Microbiology** 9:1-11.

Simões AS, Mori RY, Faria R, Castro HF, Mendes AA. (2010) Desempenho da matriz híbrida sio₂-quitosana na imobilização da lipase microbiana de *Candida rugosa*. **Quimica Nova** 34:33-38.

Soleimani M, Hosseini H, Pilevar Z, Mehdizadeh M, Carlin F. (2017) Prevalence, molecular identification and characterization of *Bacillus cereus* isolated from beef burgers. **Journal of Food Safety** 38:1-8.

Stadhouders J. (1992) The enumeration of spores and vegetative cells of *Bacillus cereus*. **Bulletin of the International Dairy Federation** 275:15-18.

Tamang JP, Watanabe K, Holzapfel WH. (2016) Review: Diversity of Microorganisms in Global Fermented Foods and Beverages. **Frontiers in Microbiology** 7:377.

Vidal AMC, Salotti BM, Rossi Junior OD, Penna ALB. (2005) Evolução do índice proteolítico e do comportamento reológico durante a tempo de prateleira de leite UAT/UHT. **Food Science and Technology** 698-704.

Viegas S, Cunha IC, et al. (2015) Investigação laboratorial de surtos de toxinfecções alimentares, 2014. **Boletim Epidemiológico Observações (INSA)** 4:4-6.

Vieira KP, Ledesma MM, Rosa CM, Hasegawa RH. (2008) Contaminação de queijo Minas frescal por bactérias patogênicas: um risco à saúde. **Conscientiae Saúde** 7:201-206.

Von Stetten F, Mayr R, Scherer S. (1999) Climatic influence on mesophilic *Bacillus cereus* and psychrotolerant *Bacillus weihenstephanensis* populations in tropical, temperate and alpine soil. **Environmental Microbiology** 1:503–515.

Wehrle E, Morakev M, Dietrich R, Bürk C, Didier A, Märtlbauer E. (2009) Comparison of multiplex PCR, enzyme immunoassay and cell culture methods for the detection of enterotoxinogenic *Bacillus cereus*. **Journal of Microbiological Methods** 78:265-270.

Wong HC, Chang MH, Fan JY. (1988) Incidence and characterization of *Bacillus cereus* isolates contaminating dairy products. **Applied and Environmental Microbiology** 54:699-702.

Zhou G, Liu H, He J, Yuan Y, Yuan Z. (2008) The occurrence of *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis* and *B. mycoides* in Chinese pasteurized full fat milk. **International Journal of Food Microbiology** 121:195-200.

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