



**Politécnico
Castelo Branco**

Escola Superior de Saúde
Dr. Lopes Dias

***Bacillus cereus* em amostras alimentares**

Camila Ávila de Borba Silveira

N.º 20211441

Orientadores

Professor Doutor Francisco José Barbas Rodrigues

Professora Doutora Cristina Maria Baptista Santos Pintado

Artigo de Investigação apresentado à Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias do Instituto Politécnico de Castelo Branco para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Licenciado em Ciências Biomédicas Laboratoriais, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Cristina Maria Baptista Santos Pintado e do Professor Doutor Francisco José Barbas Rodrigues, do Instituto Politécnico de Castelo Branco.

Junho de 2025

Composição do júri

Presidente do júri

Professora Doutora Carina Alexandra Pereira Valente

Professora Adjunta da Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias do Instituto Politécnico de Castelo Branco

Orientadores

Professor Doutor Francisco José Barbas Rodrigues

Professor Adjunto da Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias do Instituto Politécnico de Castelo Branco

Professora Doutora Cristina Maria Baptista Santos Pintado

Professora Adjunta da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco

Arguente

Professor Doutor João Pedro Martins da Luz

Professor Coordenador da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco

Dedicatória

À minha família e amigos, pelo amor incondicional, apoio constante e por acreditarem em mim em todos os momentos.

Agradecimentos

Aos meus orientadores, Professor Francisco Rodrigues e Professora Cristina Pintado, expresso a minha mais sincera gratidão pela disponibilidade, exigência e incentivo ao longo do projeto.

Um agradecimento especial à Senhora Engenheira Manuela, pelo apoio técnico e orientação no laboratório, sempre acompanhada de uma palavra cheia de conhecimento, amiga e de motivação.

Estendo ainda o meu reconhecimento à Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias, à Escola Superior Agrária e a todos os docentes e técnicos que contribuíram para a minha formação ao longo do curso.

Trabalho financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT), através do centro de investigação CERNAS (Centro de Estudos de Recursos Naturais, Ambiente e Sociedade), com a referência UIDP/00681, DOI: 10.54499/UIDP/00681/2020

Resumo

Introdução: *Bacillus cereus* é uma bactéria esporulada amplamente distribuída no ambiente, associada a surtos de intoxicação alimentar por produção de enterotoxinas.

Objetivo: Foi investigar a presença de *B. cereus* em diferentes amostras alimentares e avaliar o seu potencial toxigénico através da deteção de genes de virulência por PCR Multiplex.

Metodologia: Foram analisadas 29 culturas bacterianas de *Bacillus cereus sensu lato*, sendo 25 de origem alimentar (ex. farinhas, sopas, frutos secos, azeitonas) e 4 estirpes de referência. A caracterização fenotípica incluiu observação morfológica, testes bioquímicos e culturais. Para a caracterização molecular, foram aplicadas duas reações de PCR Multiplex visando a deteção dos genes *nheA*, *nheB*, *nheC*, *cytK-1*, *cytK-2* e *ces*, comparando dois métodos de extração de DNA.

Resultados: Observou-se que 96% dos isolados alimentares continham o complexo *Nhe* e 64% o gene *cytK-2*, sugerindo potencial toxicogénico revelante. Os genes *cytK-1* e *ces* não foram detetados.

Conclusão: *B. cereus* está presente em diversos alimentos com genes associados à patogenicidade. Os resultados reforçam a necessidade de controlo microbiológico contínuo na cadeia alimentar, com aplicação de técnicas moleculares eficientes como a PCR *Multiplex* para prevenir riscos à saúde pública.

Palavras-chave

Bacillus cereus, PCR *Multiplex*, genes, enterotoxinas, alimentos

Abstract

Introduction: *Bacillus cereus* is a spore-forming bacterium commonly found in food environments and is associated with foodborne outbreaks due to its ability to produce enterotoxins.

Objective: This study aimed to investigate the presence of *B. cereus* in various food samples and assess its toxigenic potential by detecting virulence genes using Multiplex PCR.

Methodology: A total of 29 isolates were analyzed, including 25 from food samples (e.g., flour, soups, dried fruits, brined olives) and 4 reference strains. Phenotypic characterization involves morphological, biochemical, and cultural tests. For molecular analysis, two *Multiplex* PCR reactions were used to detect *nheA*, *nheB*, *nheC*, *cytK-1*, *cytK-2*, and *ces* genes. Two DNA extraction protocols were evaluated.

Results: Among the food isolates, 96% harbored the full *nhe* gene complex, and 64% carried the *cytK-2* gene, indicating significant toxigenic potential. The *cytK-1* and *ces* genes were not detected.

Conclusion: The presence of *B. cereus* with virulent genes in common food products underscores the need for continuous microbiological monitoring. *Multiplex* PCR proved to be an efficient tool for the simultaneous detection of multiple virulence markers, contributing to improved food safety management.

Keywords

Bacillus cereus, *Multiplex* PCR, genes, enterotoxins, food

1. Introdução

O grupo *Bacillus cereus*, também conhecido como *B. cereus sensu lato*, constitui uma subdivisão do género *Bacillus* que engloba oito espécies formalmente reconhecidas: *B. cereus sensu stricto*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. weihenstephanensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. cytotoxicus* e *B. toyonensis*. Estas pertencem à família *Bacillaceae* e são caracterizadas por serem bacilos Gram-positivos, formadores de esporos. *B. cereus sensu stricto* encontra-se amplamente distribuído no ambiente e assume particular importância no setor alimentar, dada a sua associação recorrente a surtos de intoxicações alimentares. (1)

A capacidade de sobrevivência em ambientes hostis deve-se à formação de esporos altamente resistentes, dificultando a sua eliminação durante o processamento e armazenamento de alimentos. (2) Adicionalmente, em condições favoráveis, é capaz de formar biofilmes, aumentando a resistência aos processos de higienização e desinfecção. (3)

O crescimento ótimo desta bactéria ocorre entre 25°C e 37°C, embora possa proliferar-se numa ampla faixa de temperaturas, entre 4°C e 50 °C, sendo, por isso classificado como mesófila, apesar de algumas estirpes apresentem características psicrófilas. A espécie demonstra igualmente uma elevada tolerância ao pH, desenvolvendo-se em ambientes que variam entre 4,9 e 9,3, o que permite a sua sobrevivência em condições extremas. (4)

Relativamente à virulência, destacam-se três principais toxinas associadas à síndrome diarreica: a Hemolisina BL (*Hbl*), a enterotoxina não-hemolítica (*Nhe*) e a citotoxina K (*cytK*). (3,5-7) Os genes responsáveis pela codificação destas toxinas podem ser identificados por técnicas moleculares, como a PCR *Multiplex*, permitindo uma análise precisa do potencial patogénico das diferentes estirpes.

A toxina *Hbl* está associada à hemólise, em particular num padrão característico conhecido de hemólise dupla, resultante da ação combinada dos três componentes da toxina- B, L1 e L2- sobre os eritrócitos. A produção desta toxina é frequentemente observada em estirpes patogénicas de *B. cereus* e está associada à a sua capacidade de lise celular e à sua função entérica. (8)

Clinicamente, o *Bacillus cereus* é responsável por duas síndromes gastrointestinais distintas. A síndrome emética é causada pela toxina cereulida (*ces*), uma molécula termo-estável e resistente ao pH gástrico. Os sintomas são náuseas e vômitos, que se manifestam entre 1 e 5 horas após a ingestão de alimentos contaminados, especialmente arroz ou massas mal conservadas. (3-5) Por outro lado, a síndrome diarreica, resulta da ingestão de alimentos contaminados com células vegetativas ou esporos que se multiplicam no intestino delgado e produzem enterotoxinas, provocando diarreia aquosa e dor abdominal, geralmente entre 8 e 16 horas após a ingestão de alimentos como carnes, produtos lácteos,

vegetais cozidos, sopas e molhos. ⁽³⁻⁷⁾ A Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) sublinha que os grupos vulneráveis como idosos, crianças, grávidas e indivíduos imunocomprometidos, apresentam maior risco face à contaminação por *B. cereus*, mesmo em concentrações reduzidas. Para prevenir esta contaminação, são fundamentais medidas como a conservação dos alimentos a temperaturas iguais ou inferiores a 4°C, a aplicação adequada de tratamentos térmicos e higienização adequada durante a preparação dos alimentos. ⁽¹⁾

Com este trabalho pretendeu-se estudar um conjunto de isolados de *Bacillus cereus* presumíveis obtidos de diferentes amostras alimentares, predominantemente de farinhas para panificação, com vista à sua caracterização fenotípica e molecular.

2. Metodologia

O presente estudo caracteriza-se por uma abordagem transversal, qualitativa e experimental. A dimensão transversal visa avaliar, num dado momento, a prevalência de contaminação por *Bacillus cereus* em amostras alimentares. A componente qualitativa centra-se na análise dos dados microbiológicos e genéticos com foco na identificação de estirpes de *B. cereus* e na deteção de genes associados à produção de enterotoxinas. O carácter experimental foi desenvolvido através da realização de ensaios laboratoriais, que permitiram a deteção da presença da bactéria e dos respetivos genes, recorrendo a técnicas microbiológicas convencionais e à metodologia determinada pela ISO 7932:2004/Amd.1:2020 e o artigo científico de Yang *et al.* (2005). ^(9,10)

Neste contexto, a questão de investigação deste estudo foca-se em: “As amostras alimentares analisadas apresentam contaminação por bactérias do grupo *Bacillus cereus* e, caso afirmativo, possuem genes codificantes de enterotoxinas detetáveis por PCR *Multiplex*?”.

2.1. Culturas bacterianas

O presente estudo inclui a análise de 29 estirpes pertencentes ao grupo *Bacillus cereus*, das quais 25 foram isolados a partir de diferentes produtos alimentares (isolados 3 a 27, Tabela 1) e 4 corresponderam a estirpes de referência (isolados 28 a 31). Estas últimas foram gentilmente fornecidas pelo Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge e empregues como controlos positivos nos ensaios efetuados.

Tabela 1- Características das amostras de *Bacillus cereus sensu lato* usadas neste trabalho.

Ref ^o Isolado	Tipo de amostra	Ano de isolamento	Proveniência	
3	Preparado para pão brioche	2013	Isolados obtidos no decurso de análises microbiológicas efetuadas no Laboratório de Microbiologia da ESACB, nos anos 2013, 2024 e 2025, e criopreservados a -80°C, até ao momento do seu uso, num criotubo com meio líquido esterilizado à base de leite desnatado e glicerol como crioprotetor.	
4	Preparado para pão branco	2013		
5	Preparado para pão brioche	2013		
6	Preparado para pão de sementes	2013		
7	Preparado para pão de mistura	2013		
8	Preparado para pão saúde	2013		
9	Farinha de trigo	2013		
10	Preparado para bolo de canela	2013		
11	Preparado "Frita fácil"	2013		
12	Preparado para scones	2013		
13	Preparado para bolo de laranja	2013		
14	Preparado para bolo "Pão de ló"	2013		
15	Preparado para bolo de chocolate	2013		
16	Preparado para bolo de amêndoa	2013		
17	Preparado para crepes	2013		
18	Sopa de feijão frade, nabíça, cenoura, arroz, cebola	2024		
19	Damascos secos, inteiros e descarçados	2024		
20	Salmoura de azeitona de mesa caseira	2025		
21	Massa clara / Preparado para bolo mármore	2013		
22	Farinha de trigo	2025		Isolados obtidos no âmbito do presente trabalho de estágio, seguindo o protocolo definido na norma ISO 7932 (2004), o qual se encontra resumido no Anexo 1
23				
24				
25	Farinha de arroz	2025		
26	Sêmola de trigo	2025		
27				
28	<i>B. cereus</i> ATCC 11778	—	<i>nheA, nheB, nheC, cytK-2</i>	
29	<i>B. cereus</i> NCTC 7464 (= <i>B. cereus</i> ATCC 10876)	—	<i>cytK-2</i>	
30	<i>B. cereus</i> NCTC 11143 (= <i>B. cereus</i> WDCM 219)	—	ces, <i>nheA, nheB, nheC</i>	
31	<i>B. cytotoxicus</i> DMS 22905	—	<i>cytK-1</i>	

2.2. Caracterização fenotípica

Cada um dos isolados do grupo *Bacillus cereus* em estudo foi inoculado em diferentes meios de cultura: 1) Agar Nutritivo (AN; Himedia, ref. M001), para confirmar a pureza e a viabilidade das culturas crioconservadas, para a obtenção de cultura jovem para os testes da catalase, da oxidase e do crescimento a 5°C, 30°C e 45°C, e para a execução de esfregaços posteriormente corados pelo método de coloração de Gram; 2) *Bacillus cereus* Agar (Biokar, ref. BK116HA) , usado para confirmar a produção de lecitinase e a reação negativa para a utilização do manitol; 3) Agar Sangue (Frilabo, ref. FRI 0066P), usado para verificar o tipo de hemólise; 4) Meio de mobilidade (preparado segundo o descrito na norma ISO 7932:2004/Amd.1:2020), para o teste da mobilidade.

2.3. Caracterização genotípica

Foi igualmente efetuado a cada um dos isolados do grupo *Bacillus cereus* em estudo a caracterização molecular por duas reações PCR *Multiplex* cujos protocolos foram implementados no Laboratório de Microbiologia da Escola Superior Agrária de Castelo Branco, com base no definido por Yang *et al.* (2005) e na norma ISO 7932:2004/Amd.1:2020, com algumas alterações. Com esta caracterização pretendeu-se verificar a presença dos genes *nheA*, *nheB*, *nheC*, *cytK-1*, *cytK-2*, *ces*.

Para determinar qual o melhor método de extração de DNA do grupo *Bacillus cereus* foram usadas as estirpes de referência *Bacillus cereus* ATCC 11778 e *Bacillus cereus* NCTC 11143 e testaram-se dois métodos distintos. O primeiro baseou-se no protocolo descrito por Doumith *et al.* (2004), segundo o qual recolheu-se uma colónia para um microtubo onde previamente foi colocado 50 µl de uma solução a 0,25% de dodecil sulfato de sódio em 0,05 N NaOH estéril, emulsionou-se, colocou-se depois o microtubo em banho-Maria a 99°C durante 15 minutos, adicionou-se 100µl de água ultrapura estéril e homogeneizou-se. O segundo seguiu a metodologia proposta por Yang *et al.* (2005). Após a extração, as amostras de DNA foram conservadas a -20°C.

A partir do DNA extraído procedeu-se à reação de amplificação A (com os *primers* específicos para os genes *nheA*, *nheB*, *nheC*) e à reação de amplificação B (com os *primers* específicos para os genes *ces*, *cytK-1*, *cytK-2*) (Tabela 2).

Tabela 2- Sequência dos primers usados, genes alvo e tamanho dos produtos de amplificação (bp), volume e concentração final na reação.

	Primers	Sequência 5'-3'	Gene alvo	Tamanho (bp)	Vol. na reação (µl)	Conc. final na reação (mM)
PCR Multiplex A (9)	NA-F1 (10µM)	ATT ACA GGG TTA TTG GTT ACA GCA GT	<i>nheA</i>	475	0,5	0,2
	NA-R1 (10µM)	T CTT GCT CCA TAC TCT CTT GGA TGC T				
	NB-F1 (10µM)	GTG CAG CAG CTG TAG GCG GT	<i>nheB</i>	328	0,5	0,2
	NB-R1 (10µM)	ATG TTT TTC CAG CTA TCT TTC GCA AT				
	NC-F1 (10µM)	GCG GAT ATT GTA AAG AAT CAA AAT GAG GT	<i>nheC</i>	557	1,0	0,4
	NC-R1 (10µM)	TTT CCA GCT ATC TTT CGC TGT ATG TAA AT				
PCR Multiplex B (10)	CK1F (10µM)	CAA T C CAG GGG CAA G T G T C	<i>cytK-1</i>	426	0,5	0,2
	CK1R (10µM)	CCT CGT GCA TCT GTT TCA TGA G				
	CK2F (10µM)	CAA TCC CTG CTA GTG CA	<i>cytK-2</i>	585	0,5	0,2
	CK2R (10µM)	GTG IAG CCT GGA CGA AGT TGG				
	EM1F (10µM)	GAC AAG AGA AAT TTC TAC GAG CAA GTA CAA T	<i>ces</i>	635	0,5	0,2
	EM1R (10µM)	GCA GCC TTC CAA TTAC TCC TTC TGC CAC AGT				

As reações de amplificação ocorreram num termociclador, em tubos de 0,2 ml Illustra *PureTaq™Ready-to-go PCR beads* (Cytiva, ref. 27955701). Cada *PureTaq™Ready-to-go PCR* contém estabilizadores, BSA, dATP, dCTP, dGTP, dTTP, ~2,5 unidades de *pureTaq DNA polymerase* e tampão de reação. Quando uma pérola é reconstituída num volume final de 25 µl, a concentração de cada dNTP é 200 µM em 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl e 1,5 mM MgCl₂. Para a reação de amplificação A pipetou-se 1,5 µl de amostra de DNA, 2 µl da mistura de *primers* e 21,5 µl de água ultrapura isenta de nucleases (Panreac Applichem, ref. A7398). Para a reação de amplificação B pipetou-se 1,5 µl de amostra de DNA, 1,5 µl da mistura de *primers* e 22,0 µl de água ultrapura.

As condições de amplificação foram as seguintes, para ambos os PCR *Multiplex*: desnaturação inicial a 95 °C durante 5 min.; 30 ciclos sucessivos com a seguinte sequência: 30 seg. a 95 °C para a desnaturação, 30 seg. a 60,0 °C para a ligação dos *primers* e 45 seg. a 72 °C para a amplificação; ciclo final de 7 minutos a 72 °C; arrefecimento a 4°C. Foi usado um controlo negativo, o controlo da reação, o qual consiste na mistura de amplificação sem DNA. Para perfazer os 25 µl substituiu-se a quantidade de DNA (1,5 µl) por água ultrapura isenta de nucleases. Foram também usadas as estirpes de referência como controlos positivos para a presença dos diferentes genes (Tabela 1).

Após a preparação do gel de agarose (Bioron, ref. 604001) a 2,5%, as amostras foram carregadas nos poços com a seguinte ordem: no primeiro poço, no poço do meio e no último poço colocou-se 5 µl de marcador (50 ng/µl) (50 bp DNA *Ladder ready-to-use*; ThermoScientific, ref. SM0373); nos restantes poços colocou-se 8 µl da mistura constituída pela amostra de DNA amplificada (5 µl) adicionada da solução de deposição, *gel loading buffer* (Sigma-Aldrich, ref. G2526) (3 µl). A corrida eletroforética para a separação dos produtos de amplificação foi realizada

numa tina de eletroforese (Bio-Rrad *Wide mini subcell GT*), com tampão TBE 1x (*Nzytech*, ref. MB11501), durante aproximadamente 1 hora e 30 minutos a uma voltagem de 90 V. O gel foi depois corado num banho com brometo de etídio (0,5 µg/ml), durante 20 minutos, observado por transiluminação UV e fotografado com câmara digital (*Kodack DC 290*) em formato *TIFF*. Finalmente, as imagens obtidas foram observadas para a identificação da presença das bandas correspondentes aos genes pesquisados, tendo em conta o tamanho (bp) dos fragmentos.

3. Resultados

Apresentam-se, posteriormente, os resultados obtidos durante o trabalho experimental, organizados em dois domínios principais: a caracterização fenotípica dos isolados e a análise molecular por PCR *Multiplex*. Os dados obtidos possibilitam uma avaliação detalhada das características microbiológicas das estirpes analisadas, bem como do seu potencial toxigénico.

3.1. Caracterização fenotípica

Em todos os casos foi observado ao microscópio ótico (X1000) a presença de bacilos Gram-positivos, a maioria com associações em cadeia (estreptobacilos) e formadora de esporos. Estes apresentaram-se maioritariamente ovais, de posição subterminal e não deformantes (Figura 1).



Figura 1- Observação microscópica do esfregaço da estirpe de referência *B. cereus* ATCC 11778, corado segundo Gram, evidenciando bacilos Gram-positivos com esporos (estrutura central, oval e incolor). Ampliação 1000x com óleo de imersão.

Verificou-se também para todos os isolados uma reação β -hemolítica em Agar Sangue, em geral larga e bem definida (Figura 2A). Particularmente em alguns isolados observou-se uma dupla hemólise (como identificado na figura 2B, 1- *B. cereus* ATCC 11778 e 2- NCTC *B. cereus* 7464)).

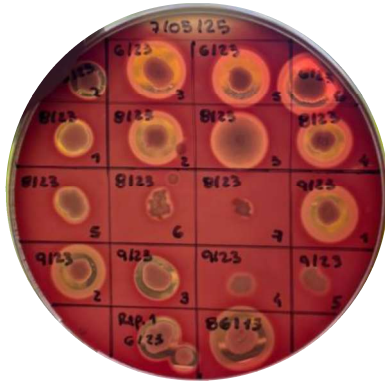


Figura 2A- Aspetto cultural de *Bacillus cereus* presumíveis em meio Agar Sangue, evidenciando zona de β -hemólise e dupla hemólise, após 24h de incubação a 30°C.



Figura 2B- Aspetto cultural de *Bacillus cereus* presumíveis em meio Agar Sangue, evidenciando zona de β -hemólise e dupla hemólise, após 24h de incubação a 30°C. 1- *B. cereus* ATCC 11778: hemólise dupla; 2- *B. cereus* NCTC 7464: hemólise dupla; 3- *B. cereus* NCTC 11143: β -hemólise; 4- *Bacillus cytotoxicus* DMS 22905: β -hemólise.

Sem exceção, todos os isolados mostraram ser positivos para a produção de catalase e 23 dos 25 isolados alimentares uma oxidase negativa. Para os isolados 19 e 22 registou-se fraca a duvidosa.

A interpretação do teste da mobilidade nem sempre foi clara, uma vez que em 28% dos isolados a leitura foi considerada de mobilidade duvidosa ((M), 5 em 25 isolados) ou de imobilidade duvidosa ((I), 2 em 25 isolados). Observaram-se 72% isolados móveis (18 de 25 isolados). Na figura 3, está um exemplo de resultado do teste de mobilidade negativo à esquerda e positivo à direita.



Figura 3- Teste de mobilidade em meio semi-sólido. À esquerda, resultado negativo (crescimento restrito à linha de inoculação), indicando bactéria imóvel. À direita, resultado positivo (dispersão do crescimento a partir da linha de inoculação), indicando bactéria móvel.

Nenhum dos isolados cresceu a 5°C até ao fim do período de observação (10 dias). Pelo contrário, para todos se observou crescimento após 24 horas de incubação, às temperaturas de 30°C e 45°C. Em 72% dos isolados, o crescimento observado foi semelhante a 30°C e 45°C.

Todos os isolados tiveram crescimento característico em *Bacillus cereus* Agar, como era de esperar, já que neste meio são seleccionadas as colónias para confirmação. Verificou-se a formação de colónias rosa-claro, sinal de não fermentação do manitol, e com a presença de um halo que evidencia a produção de lecitinase, características destes microrganismos. Observaram-se alguns casos de cultura com margem difusa ou rizoide (Figura 4), no entanto a maioria dos isolados tem cultura com margem inteira (Figura 5). A dimensão dos halos foi variável, com alguns halos de tamanho mais reduzido do que o habitual.



Figura 4- Aspeto cultural com margem difusa de *Bacillus cereus* presumíveis em meio *Bacillus cereus* Agar, após 24h de incubação a 30°C.

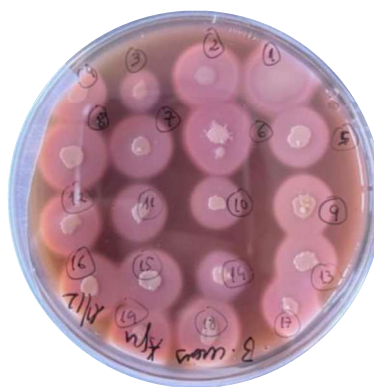


Figura 5- Aspeto cultural com margem inteira de *Bacillus cereus* presumíveis em meio *Bacillus cereus* Agar, após 24h de incubação a 30°C.

No meio de Agar Nutritivo, os isolados apresentaram maioritariamente colónias circulares, brancas, opacas, de superfície mate, margem irregular, dimensão 2 a 8mm de diâmetro (Figura 6).



Figura 6- Aspeto cultural de *Bacillus cereus* presumíveis em Agar Nutritivo após 24h de incubação a 30°C.

A confirmação da presença da bactéria foi ainda complementada por testes bioquímicos, catalase e oxidase, cujos resultados foram consistentes com o perfil esperado por esta bactéria. Paralelamente, foi avaliado o crescimento a diferentes temperaturas, durante dez dias, em meio AN, com vista a determinar a amplitude térmica de crescimento de resultado. Os resultados globais encontram-se discriminados para todos os isolados estudados na Tabela 3.

Tabela 3 -Caracterização fenotípica e genotípica de cada isolado estudado

Ref	Observação ao microscópio	B-Hemólise	Catalase	Oxidase	Mobilidade	Crescimento a 5°C	Crescimento a 30°C	Crescimento a 45°C	Presença dos genes <i>nheA</i> / <i>nheB</i> / <i>nheC</i>	Presença dos genes <i>cytK-1</i> / <i>cytK-2</i> / <i>ces</i>
3	Bacilos G+, esporos	+	+	-	M	-	+++	+++	<i>nheA</i> / <i>nheB</i> / <i>nheC</i>	___ / <i>cytK-2</i> / ___
4	Bacilos G+, esporos	+	+	-	M	-	+++	+	<i>nheA</i> / <i>nheB</i> / <i>nheC</i>	___ / ___ / ___
5	Bacilos G+, esporos	+	+	-	M	-	+++	+	<i>nheA</i> / <i>nheB</i> / <i>nheC</i>	___ / ___ / ___
6	Bacilos G+, esporos	+	+	-	M	-	+++	++	<i>nheA</i> / <i>nheB</i> / <i>nheC</i>	___ / ___ / ___
7	Bacilos G+, esporos	+	+	-	M	-	+++	+	<i>nheA</i> / <i>nheB</i> / ___	___ / ___ / ___
8	Bacilos G+, esporos	+	+	-	M	-	++	+++	<i>nheA</i> / <i>nheB</i> / <i>nheC</i>	___ / <i>cytK-2</i> / ___
9	Bacilos G+, esporos	+	+	-	(M)	-	+++	+++	<i>nheA</i> / <i>nheB</i> / <i>nheC</i>	___ / <i>cytK-2</i> / ___
10	Bacilos G+, esporos	+	+	-	(M)	-	+++	++	<i>nheA</i> / <i>nheB</i> / <i>nheC</i>	___ / ___ / ___
11	Bacilos G+, esporos	+	+	-	M	-	+++	+++	<i>nheA</i> / <i>nheB</i> / <i>nheC</i>	___ / <i>cytK-2</i> / ___
12	Bacilos G+, esporos	+	+	-	(M)	-	+++	+++	<i>nheA</i> / <i>nheB</i> / <i>nheC</i>	___ / <i>cytK-2</i> / ___
13	Bacilos G+, esporos	+	+	-	M	-	++	++	<i>nheA</i> / <i>nheB</i> / <i>nheC</i>	___ / <i>cytK-2</i> / ___
14	Bacilos G+, esporos	+	+	-	M	-	++	+	<i>nheA</i> / <i>nheB</i> / <i>nheC</i>	___ / ___ / ___
15	Bacilos G+, esporos	+	+	-	M	-	++	++	<i>nheA</i> / <i>nheB</i> / <i>nheC</i>	___ / <i>cytK-2</i> / ___
16	Bacilos G+, esporos	+	+	-	M	-	+++	+++	<i>nheA</i> / <i>nheB</i> / <i>nheC</i>	___ / <i>cytK-2</i> / ___
17	Bacilos G+, esporos	+	+	-	M	-	+++	+++	<i>nheA</i> / <i>nheB</i> / <i>nheC</i>	___ / <i>cytK-2</i> / ___
18	Bacilos G+, esporos	+	+	-	(M)	-	+++	+++	<i>nheA</i> / <i>nheB</i> / <i>nheC</i>	___ / <i>cytK-2</i> / ___
19	Bacilos G+, esporos	+	+	+/-	M	-	+++	+++	<i>nheA</i> / <i>nheB</i> / <i>nheC</i>	___ / ___ / ___
20	Bacilos G+, esporos	+	+	-	M	-	+++	+++	<i>nheA</i> / <i>nheB</i> / <i>nheC</i>	___ / <i>cytK-2</i> / ___
21	Bacilos G+, esporos	+	+	-	(M)	-	+++	+++	<i>nheA</i> / <i>nheB</i> / <i>nheC</i>	___ / <i>cytK-2</i> / ___
22	Bacilos G+, esporos	+	+	+/-	M	-	+++	+++	<i>nheA</i> / <i>nheB</i> / <i>nheC</i>	___ / <i>cytK-2</i> / ___
23	Bacilos G+, esporos	+	+	-	M	-	+++	+++	<i>nheA</i> / <i>nheB</i> / <i>nheC</i>	___ / <i>cytK-2</i> / ___

24	Bacilos G+, esporos	+ DH	+	-	M	-	+++	+++	<i>nheA</i> / <i>nheB</i> / <i>nheC</i>	___ / <i>cytK-2</i> / ___
25	Bacilos G+, esporos	+ DH	+	-	(Im)	-	+++	+++	<i>nheA</i> / <i>nheB</i> / <i>nheC</i>	___ / <i>cytK-2</i> / ___
26	Bacilos G+, esporos	+ DH	+	-	M	-	+++	+++	<i>nheA</i> / <i>nheB</i> / <i>nheC</i>	___ / ___ / ___
27	Bacilos G+, esporos	+	+	-	(Im)	-	+++	+++	<i>nheA</i> / <i>nheB</i> / <i>nheC</i>	___ / ___ / ___
28	Bacilos G+, esporos	+ DH	+	-	M-	-	+++	+++	<i>nheA</i> / <i>nheB</i> / <i>nheC</i>	
29	Bacilos G+, esporos	+ DH	+	-	M	-	+++	+++	<i>nheA</i> / <i>nheB</i> / <i>nheC</i>	
30	Bacilos G+, esporos	+	+	-	Im	-	+++	+++	<i>nheA</i> / <i>nheB</i> / <i>nheC</i>	
31	Bacilos G+, esporos	+*	+	-	Im	-	+++	+++	<i>nheA</i> / <i>nheB</i> / <i>nheC</i>	

*β-Hemólise com halo reduzido; DH→ Hemólise dupla; +/- → Resultado positivo fraco; (M) (Im) →Dúvida entre móvel e imóvel; +++ → Crescimento abundante (muito bom crescimento), ++ → Crescimento moderado (crescimento médio), + → Crescimento fraco (pouco crescimento)

3.2. Análise molecular por PCR *Multiplex*

O primeiro ensaio de PCR *Multiplex* teve como propósito testar os *primers* para os genes *nheA* (475 bp), *nheB* (328 bp) e *nheC* (557bp) em estirpes de referência de *Bacillus cereus*, bem como comparar dois métodos de extração de DNA, sendo o poço 1 e 3 referente ao método segundo Doumith *et al.* (2004) e o poço 1' e 3' ao método segundo Yang *et al.* (2005). As estirpes de referência analisadas formam a *B. cereus* ATCC 11778 (poço 1 e 1') e *B. cereus* NCTC 11143 (poço 3 e 3'). O ensaio foi feito em duplicado.

Os resultados obtidos mostraram bandas nos três tamanhos esperados em todas as amostras, indicando a presença de todos os genes em ambas as estirpes, independentemente do método de extração. Destes dois métodos, o selecionado para o estudo foi o método de Doumith *et al.* (2004), por ter obtido resultados mais consistentes, com bandas mais nítidas e intensas, indicando uma extração de DNA mais simples, de melhor qualidade e fiabilidade, como apresentado na Figura 7.

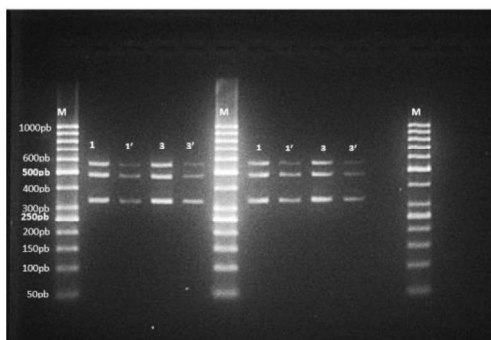


Figura 7- Gel de agarose referente ao 1.º ensaio de PCR *Multiplex* para detecção dos genes *nheA* (475 bp), *nheB* (328 bp) e *nheC* (557 bp) em estirpes de referência de *Bacillus cereus*. Avaliação comparativa de dois métodos de extração de DNA: método de Doumith *et al.* (2004) (poços 1 e 3) e método de Yang *et al.* (2005) (poços 1' e 3').

A análise dos géis de eletroforese refere-se à deteção, por PCR *Multiplex*, dos genes não-hemolíticos *nheA*, *nheB* e *nheC*, dos genes *cytK-1* e *cytK-2*, assim como do gene *ces* em isolados de *B. cereus* proveniente de diferentes produtos alimentares. Os isolados analisados correspondem amostras de farinhas, preparados para pão, bolos e outros géneros alimentícios como sopa, damascos secos e azeitonas. Em ambos os géis, foram incluídos controlos positivos (estirpe de referência contendo os genes em estudo) e controlos de reação (mistura sem DNA) para validar a especificidade e a fiabilidade dos ensaios realizados.

No estudo, para estimar os tamanhos dos fragmentos, utilizou-se um marcador (M) de 50 bp, com bandas de referência entre 50 bp e 1000bp, permitindo a confirmação visual dos genes amplificados nos géis de agarose a 2,5%. As imagens que correspondem a estes resultados encontram-se abaixo apresentadas, como Figura 8,9,10 e 11.

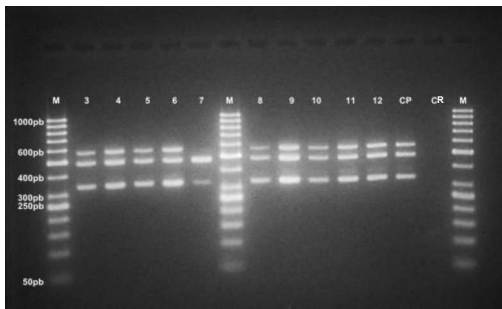


Figura 8- 1º Gel de Identificação de genes não-hemolíticos (*nheA*, *nheB* e *nheC* em *Bacillus cereus* em isolados de produtos alimentares (isolados com as ref. 3,4,5,6,7,8,9,10,11,12 – ver tabela 1). **CP-** *Bacillus cereus* NTCT 11143 (controlo positivo para os genes *nheA*, *nheB* e *nheC*); **CR-** Controlo negativo (sem DNA).

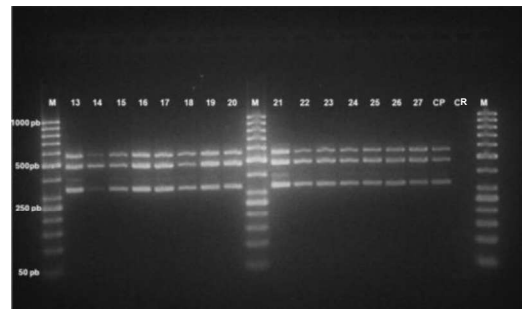


Figura 9- 2º Gel de identificação de genes não-hemolíticos (*nheA*, *nheB* e *nheC* em *Bacillus cereus* em isolados de produtos alimentares (isolados com as ref. 13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27 – ver tabela 1). **CP-** *Bacillus cereus* NTCT 11143 (controlo positivo para os genes *nheA*, *nheB* e *nheC*); **CR-** Controlo negativo (sem DNA).

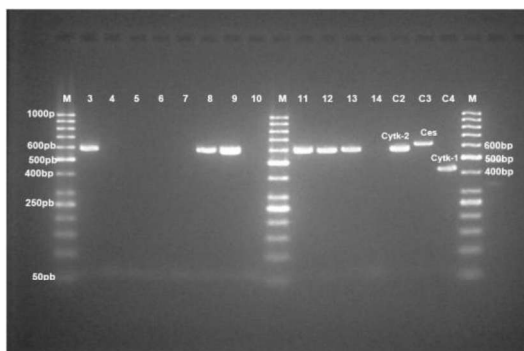


Figura 10- 3º Gel de Identificação dos genes *cytK-1*, *cytK-2* e *ces* em *Bacillus cereus* isolados de produtos alimentares (isolados com as ref. 3,4,5,6,7,8,9,10,11,12 – ver tabela 1). **C2-** *B. cereus* NCTC 7464 (controlo positivo para o gene *cytK-2*); **C3-** *B. cereus* NCTC 11143 (controlo positivo para o gene *ces*); **C4-** *Bacillus cytotoxicus* DSM 22905 (controlo positivo para o gene *cytK-1*).

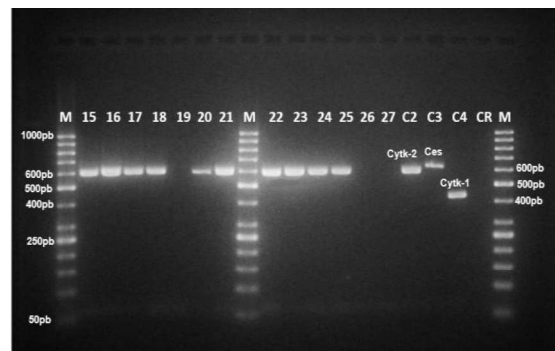


Figura 11- 4º Gel de identificação dos genes *cytK-1*, *cytK-2* e *ces* em *Bacillus cereus* isolados de produtos alimentares (isolados com as ref.13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27 – ver tabela 1) **C2-** *B. cereus* NCTC 7464 (controlo positivo para o gene *cytK-2*); **C3-** *B. cereus* NCTC 11143 (controlo positivo para o gene *ces*); **C4-** *Bacillus cytotoxicus* DSM 22905 (controlo positivo para o gene *cytK-1*); **CR-** Controlo negativo (sem DNA)

4. Discussão

A análise dos 29 isolados permitiu confirmar a presença de estirpes presumíveis do grupo *Bacillus cereus* em diversos tipos de amostras alimentares, nomeadamente farinhas, preparados para pão e bolo, sopa, damascos secos e azeitonas em salmoura. A identificação presuntiva baseou-se na observação da morfologia colonial em meios seletivos e diferenciais, coloração de Gram e realização de testes bioquímicos complementares, cujos resultados foram consistentes com o perfil característico da espécie.

Em meio *Bacillus cereus* Agar, observou-se a formação de colónias com tonalidade rosa-claro, associadas à não fermentação do manitol, e presença de halo de precipitação, indicativa de atividade e lecitinase, características fenotípicas típicas de *B. cereus*, conforme descrito na bula da Biokar. Em Agar Sangue, todas as estirpes apresentaram β -hemólise, sendo que várias evidenciaram hemólise dupla, fenómeno fenotípico associado à produção da toxina Hbl, tal como descrito por Senesi e Ghelardi (2010) e por Märthbauer e Granum (2021).^(3,8)

As observações microscópicas revelaram bacilos Gram-positivos, com esporos ovais, centrais, não deformantes e incolores, padrão morfológico típico do género *Bacillus*. A esporulação foi evidente em todas as culturas, corroborando os dados de Drobniowski (1993) e Bottone, E.J. (2010), que destacam a formação de esporos como um mecanismo fundamental de resistência e persistência em alimentos.^(2,4)

Do ponto de vista bioquímico, as estirpes revelaram-se catase positiva e, maioritariamente, oxidase negativas, com comportamento de mobilidade variável. O crescimento foi avaliado a diferentes temperaturas ao longo de dez dias, evidenciando desenvolvimento a 30°C e 45°C, mas não a 5°C. Tais dados confirmam o perfil mesófilo e termotolerante da espécie, sendo o crescimento a baixas temperaturas restrito a estirpes psicotróficas, conforme indicado por Drobniowski (1993) e pela EFSA (2016). Esta plasticidade térmica, associada à esporulação, contribui para a elevada perseverança do microrganismo em contextos de processamento e armazenamento, dificultando a sua eliminação.^(1,2,4)

A análise molecular por PCR *Multiplex* demonstrou-se eficaz na deteção simultânea de múltiplos genes de virulência. Os protocolos adotados, baseados em Yang *et al.* (2005) e na ISO, foram adaptados para o desenvolvimento deste estudo. A escolha do método de extração de DNA proposto por Doumith *et al.* (2004) revelou-se adequada, permitindo a obtenção de bandas nítidas e reprodutíveis. O complexo génico *Nhe* (*nheA*, *nheB* e *nheC*), codificador da toxina não-hemolítica, foi detetado em 24 das 25 estirpes alimentares (96%). Esta toxina é reconhecido como um dos principais fatores de virulência entérica de *B. cereus*, sendo a coexpressão das três subunidades essencial para a sua atividade citotóxica, como referido por Ramarao *et al.* (2020), Senesi e Ghelardi (2010) e por Märthbauer e Granum (2020).^(3,6,8)

A ausência do gene *nheC* numa das estirpes (isolado n.º 7) pode comprometer a formação do complexo *Nhe* na sua conformação funcional completa, resultando numa redução significativa da atividade citotóxica. Embora esta limitação possa atenuar o efeito da toxina, não exclui totalmente o seu potencial patogénico, especialmente em contextos onde o hospedeiro apresente maior sensibilidade. Esta carência estrutural pode, assim, afetar a eficácia da ação entérica, mas não inviabiliza por completo. ⁽⁷⁾ Esta hipótese é reforçada por Toril Lindbäck *et al.* (2010), que comprovam que a ausência do gene *nheC* pode reduzir a atividade da toxina para cerca de 2% do nível tóxico habitual, evidenciando o papel essencial desta subunidade na expressão do fenótipo citotóxico. ⁽¹¹⁾

A deteção do gene *cytK-2* foi detetado em 16 das 25 estirpes (64%), valor que representa uma prevalência significativa, reforçando o potencial toxigénico dos isolados. A *cytK-2* está associada a quadros diarreicos, sendo considerada um marcador genético revelante de virulência em *B. cereus*, com efeitos sinérgicos potenciais quando coexpressa com *Nhe*, tal como referido pela EFSA. ^(1,12) Por outro lado, os genes *cytK-1* e *ces* não foram detetados. Essa ausência está em consonância com a natureza das amostras. O gene *cytK-1* é geralmente restrito à espécie *Bacillus cytotoxicus*, espécie menos comum em alimentos de origem vegetal; o gene *ces*, responsável pela produção da toxina emética cereulida, é mais regularmente associado a arroz ou massas inadequadamente conservadas, conforme especificado por Ej, B (2010), e De Jaboticabal *et al.* (2017). ^(2,5)

Nas amostras de farinhas e produtos de panificação, foram identificadas estirpes portadores de genes de virulência compatíveis com *B. cereus*, o que está de acordo com os achados de Rossi *et al.* (2021), que demonstraram a termoresistência de esporos de *B. cereus* em farinhas de trigo. ⁽¹³⁾ Embora este estudo não tenha realizado contagens microbiológicas, a deteção do complexo *Nhe* sugere risco toxigénico. Considerando que os esporos sobrevivem ao tratamento térmico convencional, estes resultados sustentam a necessidade de monitorização em todas as etapas da cadeia produtiva.

Na amostra de sopa analisada, foi detetado o complexo *Nhe* completo, o que também indica potencial produção de enterotoxinas, apesar do ter sido submetido a pasteurização e refrigeração. Tal ocorrência pode estar associada a falhas na refrigeração, permitindo a germinação dos esporos e posterior produção de toxinas. Este cenário é certificado pelos dados de Alberghini *et al.* (2023), que documentaram crescimento de *B. cereus* em sopas vegetais refrigeradas, mesmo após tratamentos térmicos adequados. ⁽¹⁴⁾

No caso das azeitonas em salmoura, a deteção do complexo *Nhe* sugere a presença de estirpes enterotoxigénicas, apesar das condições conservantes da matriz. Estudos como o de Guinebretière *et al.* (2013) salientam a influência de parâmetros como pH e o teor salino na viabilidade e expressão de toxinas por *B. cereus*, fatores que merecem avaliação futura neste tipo de produto. ⁽¹⁵⁾

Metodologicamente, a aplicação da PCR *Multiplex*, revelou-se eficaz para a detecção simultânea dos genes. Yang *et al.* (2005) destacam que a qualidade do DNA foi determinante para o sucesso de reações *Multiplex*, devido à competição entre *primers*. A adoção do método de extração de DNA descrito por Doumith *et al.* (2004) designou-se, neste contexto, adequada, permitindo a obtenção de ampliações consistentes e reprodutíveis.

5. Conclusão

O presente estudo permitiu comprovar a ocorrência de estirpes presumíveis do grupo *Bacillus cereus* nas diversas amostras alimentares. A caracterização fenotípica dos isolados revelou perfis morfológicos, culturais e bioquímicos compatíveis com *B. cereus sensu lato*, evidenciando-se a presença de bacilos Gram-positivos esporulados, produção de lecitinase, hemólise β (incluindo casos de hemólise dupla) e crescimento em diferentes temperaturas, características frequentemente associadas a estirpes patogênicas.

A caracterização molecular, realizada por PCR *Multiplex*, demonstrou ser uma abordagem eficiente para a detecção simultânea de múltiplos genes de virulência, com resultados robustos e reprodutíveis. A elevada prevalência dos genes *nheA*, *nheB* e *nheC* (detetados em 96% dos isolados alimentares) confirma a disseminação do complexo *Nhe* entre as estirpes estudadas, o qual está diretamente relacionado com a capacidade enterotoxigênica de *B. cereus*. A presença do gene *cytK-2* em 64% dos isolados reforça ainda mais este potencial toxigênico. Por outro lado, os genes *cytK-1* e *ces* não foram detetados, o que se encontra em concordância com a natureza das amostras analisadas e com a literatura científica.

Os dados obtidos alertam para a necessidade de vigilância contínua da cadeia alimentar, sobretudo em produtos que, mesmo sujeitos a processamento térmico, podem albergar esporos de *B. cereus* resistentes e potencialmente patogênicos. A identificação de estirpes com genes de virulência em alimentos de consumo corrente constitui um risco relevante para a saúde pública, sobretudo em grupos populacionais mais suscetíveis.

Neste contexto, destaca-se a importância da adoção de técnicas moleculares sensíveis e específicas, como a PCR *Multiplex*, no âmbito da vigilância e segurança alimentar.

6. Referências Bibliográficas

1. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). (2016). Risks for public health related to the presence of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. including *Bacillus thuringiensis* in foodstuffs. *EFSA Journal*, 14(7), e04524. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4524>
2. Bottone, E. J. (2010). *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(2), 382–398. <https://doi.org/10.1128/CMR.00073-09>
3. Märtilbauer, E., & Granum, P. E. (2021). *Bacillus cereus* toxins. *Toxins*, 13(5), 295. <https://doi.org/10.3390/toxins13050295>
4. Drobniowski, F. A. (1993). *Bacillus cereus* and related species. *Clinical Microbiology Reviews*, 6(4), 324–338. <https://doi.org/10.1128/cmr.6.4.324>
5. De Jaboticabal, C. A. G., & Rossi, M. (2017). *Bacillus cereus: Caracterização genômica na cadeia produtiva de leite e influência da pasteurização na expressão de genes relacionados a toxinas diarreicas* [Dissertação de mestrado, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”]. Repositório Institucional UNESP. <http://hdl.handle.net/11449/152460>
6. Ramarao, N., Tran, S.-L., Marin, M., & Vidic, J. (2020). Advanced methods for detection of *Bacillus cereus* and its pathogenic factors. *Sensors*, 20(9), 2667. <https://doi.org/10.3390/s20092667>
7. Fonseca, P. (2010). *Análise da expressão e produção de enterotoxinas e toxina emética em Bacillus cereus* [Dissertação de mestrado, Universidade de Lisboa]. Repositório da ULisboa.
8. Senesi, S., & Ghelardi, E. (2010). Production, secretion and biological activity of *Bacillus cereus* enterotoxins. *Toxins*, 2(7), 1690–1703. <https://doi.org/10.3390/toxins2071690>
9. International Organization for Standardization. (2020). *ISO 7932:2004/Amd 1:2020 – Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of presumptive Bacillus cereus – Colony-count technique at 30 °C – Amendment 1*. Geneva, Switzerland: ISO.
10. Yang, I. C., Shih, D. Y. C., Huang, T. P., Huang, Y. P., Wang, J. Y., & Pan, T. M. (2005). Establishment of a novel multiplex PCR assay and detection of toxigenic strains of the species in the *Bacillus cereus* group. *Journal of Food Protection*, 68(10), 2123–2130. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-68.10.2123>
11. Lindbäck, T., Hardy, S. P., Dietrich, R., Sødring, M., Didier, A., Moravek, M., Fagerlund, A., Bock, S., Nielsen, C., Casteel, M., Granum, P. E., & Märtilbauer, E. (2010). Cytotoxicity of the *Bacillus cereus* Nhe enterotoxin

- requires specific binding order of its three exoprotein components. *Infection and Immunity*, 78(9), 3813–3821. <https://doi.org/10.1128/IAI.00247-10>
12. Granum, P. E., & Lund, T. (2006). *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiology Letters*, 157(2), 223–228. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb12776.x>
13. Rossi, E. M., Mahl, S. C., Spaniol, A. C., Honorato, J. F. B., & Rocha, T. (2021). Evaluating the thermoresistance of *Bacillus cereus* strains isolated from wheat flour. *Research, Society and Development*, 10(6), e2510615268. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i6.15268>
14. Alberghini, G., Fabbian, A., Ferioli, M., Miotti Scapin, R., Catellani, P., & Giaccone, V. (2023). The growth potential of *Bacillus cereus* in ready-to-reheat vegetable soups. *Hygiene*, 3(3), 339–350. <https://doi.org/10.3390/hygiene3030025>
15. Guinebretière, M.-H., Auger, S., Galleron, N., Contzen, M., De Sarrau, B., De Buyser, M.-L., Lamberet, G., Fagerlund, A., Granum, P. E., Lereclus, D., De Vos, P., Nguyen-The, C., & Sorokin, A. (2013). *Bacillus cytotoxicus* sp. nov. is a novel thermotolerant species of the *Bacillus cereus* group occasionally associated with food poisoning. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(Pt 1), 31–40. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.030627-0>