

Aislamiento e identificación de *Bacillus cereus* a partir de dos variantes de arroz comercial (*Oryza sativa* L.)

Irasema Pérez-Portuondo, Teresa Orberá-Ratón y José L. Tamayo-Núñez.

Centro de Estudios de Biotecnología Industrial. Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Oriente, Patricio Lumumba s/n, Santiago de Cuba, Cuba. Código Postal: 90500, Correo electrónico: iperez@cebi.uo.edu.cu

Recibido: 26 de enero de 2010

Aceptado: 24 de enero 2011

Palabras clave: *Bacillus cereus*, intoxicación alimentaria, arroz, toxinas, identificación de *Bacillus*.
Key words: *Bacillus cereus*, food poisoning, rice, toxins, *Bacillus* identification.

RESUMEN. *Bacillus cereus* es una bacteria habitante común del suelo, de importancia tanto para la salud pública como para la Biotecnología. Con el objetivo de aislar ejemplares de esta bacteria para su utilización en estudios posteriores, así como de evaluar su permanencia en el arroz cocido, se desarrolló el protocolo propuesto por Kramer y cols. (1982). Con este fin, se tomaron muestras de arroz en grano con cáscara y de arroz cocido y se buscaron bacterias con propiedades hemolíticas y lecitinasas positivas. La identificación de los aislados se realizó mediante pruebas morfológicas y bioquímicas. Se obtuvieron 14 aislados, ocho de los cuales reunían las características distintivas de *B. cereus*, comparados con *B. cereus* ATCC 11778, incluida la resistencia a antibióticos. No se observó presencia de cuerpos parasporales típica de *B. thuringiensis*. Se comprobó que en el arroz cocido, transcurridas ocho horas de la cocción, pueden aislarse bacterias hemolíticas y lecitinasas positivas, en mayor número si este es conservado a temperatura ambiente, lo que convierte este alimento en potencialmente peligroso para su consumo. Estos resultados sugieren también la posibilidad de emplear al arroz como fuente para aislamiento de *B. cereus*.

ABSTRACT. *Bacillus cereus* is a common soil bacterium with importance for public health and Biotechnology. With the aim to isolate strains of this bacterium for afterward studies, and to evaluate their permanence in cooked rice, the Kramer *et al.* (1982) protocol was used. In this sense, samples of rice grains with shell and cooked rice were collected and bacteria with hemolytic and positive lecithinase properties were looked. Identification of the isolates was carried out by means of morphological and biochemical tests. Fourteen isolates were obtained, with eight of these combining distinctive characteristics of *B. cereus* as compared with *B. cereus* ATCC 11778, including antibiotics resistance. Presence of parasporal bodies, typical of *B. thuringiensis*, was not observed. It was verified that hemolytic and lecithinase positive bacteria can be isolated from the cooked rice eight hours after the cooking, increasing the number of isolated if this is conserved to ambient temperature, which transform this food in potentially dangerous for consume. These results suggest moreover the possibility to use the commercial rice as source to *B. cereus* isolating.

INTRODUCCIÓN

El grupo del *Bacillus cereus* (*B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. anthracis*), es de gran interés tanto para la taxonomía como para la salud pública. Mientras los miembros de este grupo se diferencian fácilmente de los otros miembros de los bacilos aerobios formadores de esporas (BAFE), existen dificultades para distinguirlos dentro del grupo. Son organismos mesófilos y neutrófilos, cuyas esporas no deforman el esporangio. Las características clásicas para diferenciarlos de los otros BAFE es su incapacidad para producir ácido a partir

del manitol y su producción de lecitinasas. Dos especies son usualmente móviles (*B. cereus* y *B. thuringiensis*) y tres especies son hemolíticas y resistentes a penicilina (*B. cereus*, *B. thuringiensis* y *B. mycoides*). *B. anthracis* es el único sensible a fagos gamma.¹ Las características típicas de cada especie como el crecimiento rizoidal de *B. mycoides*, la formación de cristales por *B. thuringiensis* y las toxinas de *B. anthracis* son dependientes de plásmidos. Una especie sin estas características es prácticamente indistinguible del *B. cereus*. Helganson y cols. apuntaron con sus resultados que esta bacteria

Correspondencia:

M.C. Irasema Pérez Portuondo

Centro de Estudios de Biotecnología Industrial. Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Oriente, Patricio Lumumba s/n, Santiago de Cuba, Cuba. Código Postal: 90 500, Correo electrónico: iperez@cebi.uo.edu.cu

podiera ser la especie ancestral y concluyeron que era una sola especie con variedades aportadas por plásmidos (*B. thuringiensis* y *B. anthracis*), pero no se ha alcanzado consenso en esta materia.^{2,3}

De interés para la salud pública es que dentro de este grupo, se encuentra una especie muy patógena del grupo de riesgo tres (*B. anthracis*), otra causante de diarreas, vómitos y usualmente oportunista del grupo de riesgo dos (*B. cereus*), un saprófito no peligroso del suelo (*B. mycoides*) y un organismo ampliamente usado como control biológico (*B. thuringiensis*).¹ También se han registrado algunas cepas específicas no toxigénicas de *B. cereus* utilizadas como probióticos.^{4,5}

B. cereus es una conocida bacteria productora de toxo-infecciones alimentarias. Entre los alimentos que han estado más involucrados en estas intoxicaciones se encuentra el arroz.⁶ Debido a las condiciones particulares de cultivo en los arrozales (una parte del tiempo anegada, en anaerobiosis), donde esta bacteria comprende aproximadamente el 10 % de la microflora del suelo, en el arroz crudo tanto con cáscara como descascarado es posible encontrar cantidades en el orden de 10³ unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de esta bacteria.^{7,8}

B. cereus produce fosfatidilinositol hidrolasa, una enzima empleada en los estudios de la membrana celular de eucariotas. Esta bacteria, a pesar de no estar considerada como un patógeno obligado sino oportunista, tiene enzimas como la anteriormente referida y la esfingomielinasa, capaces de atacar moléculas propias de los eucariotas como el fosfoinositol y la esfingomielina.^{9,10} Lo antes dicho la convierte en un organismo con oportunidades de interés para la Biotecnología. Esta bacteria se aísla generalmente del suelo, no se tienen registros del arroz como fuente de aislamiento para otros usos que no sean los de salud y alimentos. Por lo que este trabajo se propuso la utilización del arroz en dos variantes para el aislamiento de *B. cereus* para posteriores estudios, así como la evaluación de su permanencia en el arroz cocido, teniendo en cuenta su implicación en las intoxicaciones alimentarias.

MATERIALES Y MÉTODOS

Toma de muestras

Todas las muestras de arroz blanco empleadas fueron obtenidas del mercado local.

Se tomaron 25 g de granos de arroz sin descascarar y se añadieron en 100 mL de caldo nutriente. Se incubó a 35 °C durante 18 h para desarrollar el aislamiento.¹¹ También se tomaron muestras de arroz cocido y conservado a temperatura ambiente estable (≈ 32 °C) en condiciones domésticas durante ocho horas (muestras tomadas a las tres y ocho horas). Se pesó un gramo de arroz cocido recogido en los tiempos seleccionados y se añadió en 99 mL de caldo nutriente con agitación y se dejó reposar durante unos minutos. Ambos volúmenes de caldo nutriente constituyeron las disoluciones madres.

Aislamiento e identificación presuntiva

El aislamiento de cepas de *Bacillus cereus*, se desarrolló por el protocolo sugerido por Kramer y col., 1982, el cual se fundamenta en la capacidad hemolítica y lecitinasa de esta bacteria. Con este fin, se efectuaron diluciones seriadas a partir de las disoluciones madres. La dilución 1 : 1 000 se inoculó en medio agar sangre (medio CBA). Las colonias que a las 24 h de crecidas presentaron halos de hidrólisis (capacidad hemolítica) fueron reinoculadas en medio *Bacillus cereus* (BC), el cual contenía lecitina

de huevo. Posteriormente, se aislaron y purificaron las colonias que incubadas a 30 °C durante 24 h, presentaron halos de hidrólisis (capacidad lecitinasa). Estas colonias fueron consideradas como presuntos *B. cereus*.⁸

Ensayos de confirmación

La confirmación de la identidad de las bacterias aisladas se realizó mediante varias técnicas como tinción de Gram con la que se observó la coloración y la forma de la célula, presencia de esporas y su ubicación por medio del método de Schaeffer-Fulton o tinción con verde malaquita, producción de catalasa, degradación del almidón, producción de ácido a partir de varios azúcares, capacidad de reducir el nitrato a nitrito, motilidad por medio del método de la *gota colgante*, características del crecimiento colonial.^{12,13} Para evaluar la resistencia a antibióticos, se desarrolló el método de Kirby-Bauer, consistente en evaluar la resistencia y sensibilidad de las bacterias a distintos antibióticos contenidos en discos de papel.¹⁴ Durante los ensayos experimentales, se utilizó como cepa control la bacteria de *B. cereus* ATCC 11778, obtenida por donación de la Colección de Cultivos del Centro de Estudios de Biotecnología Industrial de la Universidad de Oriente (Santiago de Cuba).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Arroz comercial con cáscara

En general, el grano de arroz con cáscara está contaminado con muchos saprófitos que constituyen la microflora del arroz, entre los que se pueden encontrar miembros del grupo *Pseudomonadaceae*, coliformes, bacterias formadoras de endosporas, levaduras y mohos. Tomando en cuenta lo anterior y que no se desarrolló el calentamiento del medio para obtener solo las esporas, se tomaron 25 g del arroz sin descascarar y se llevó a caldo nutriente para extraer todos los microorganismos que existieran en él. El método de selección descrito permitió escoger entre todos estos a las bacterias que reunían las características de interés. Con este método, se obtuvieron 90 aislados con características hemolíticas, de los cuales cuatro resultaron lecitinasa positiva para un 4 %. Se desarrollaron las técnicas confirmativas a los cuatro aislados. Las colonias formadas fueron blancas grisáceas con aspecto cremoso con bordes irregulares. Las células de los cuatro aislados fueron móviles, con forma de bastones con bordes redondeados, Gram positivas y con una espora central. En dos colonias estas esporas no deformaban el esporangio y en otras dos, sí lo deformaban. Estas últimas fueron descartadas del estudio. No se observó el crecimiento rizoide típico de las colonias del *B. mycoides*. Todos los resultados de las pruebas bioquímicas y degradativas coincidieron con los obtenidos con la cepa control utilizada (Tabla 1).

Los resultados fueron confrontados con los obtenidos por Priest y cols. y la información que ofrece el manual Bergey, lo que permitió ubicar a los dos aislados dentro del Género *Bacillus*, grupo del *Bacillus cereus/Bacillus thuringiensis*.^{13,15}

Se observó resistencia a los antibióticos β-lactámicos (penicilina) y cefalosporinas (cefotaxima), así como sensibilidad a otros tipos de agentes antimicrobianos (cloranfenicol y vancomicina) (Tabla 2).

Los resultados de la evaluación de la acción de los antibióticos sobre las bacterias aisladas de arroz en grano concordaron con los obtenidos por otros autores que plantean que dentro del grupo *B. cereus/B. thuringiensis*, estas dos especies también son capaces de exhibir una

Tabla 1. Características bioquímicas y degradativas de los cuatro aislados de arroz comercial con cáscara.

Pruebas bioquímicas y degradativas	Aislados de arroz ¹				<i>Bacillus cereus</i>
					ATCC 11778
Formación de ácido correspondiente a					
Glucosa	+	+	+	+	+
Arabinosa	-	-	-	-	-
Lactosa	-	-	-	-	-
Maltosa	+	+	+	+	+
Manitol	-	-	-	-	-
Xilosa	-	-	-	-	-
Catalasa	+	+	+	+	+
Degradación de almidón	+	+	+	+	+
Reducción de nitrato	+	+	+	+	+

¹En grano con cáscara. + Positivo. - Negativo.

Tabla 2. Sensibilidad de los aislados de arroz comercial con cáscara ante diferentes tipos de antibióticos.

Antibióticos (μg)	Aislados Características		<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778
Penicilina 6	R	R	R
Cefotaxima 30	R	R	R
Cloranfenicol 30	S	S	S
Vancomicina 30	S	S	S

R Resistente. S Sensible.

marcada resistencia a antibióticos del tipo β -lactámicos debido a su capacidad de producir β -lactamasas de dos tipos que destruyen a la penicilina y a las cefalosporinas incluso, de tercera generación como la cefotaxima evaluada en el estudio.^{16,17} Las especies de *B. cereus* y *B. thuringiensis* son similares y comparten muchos genes en común, por lo cual resulta muy difícil separarlos por su fenotipo.² Hasta el momento, hay una característica que permite diferenciarlas y es la existencia de plásmidos que codifican para la δ -endotoxina observable a través de la presencia de cristales o cuerpos parasporales asociados a la esporulación en *B. thuringiensis*.^{2,18-20} Basado en este antecedente, se realizó la búsqueda de cuerpos parasporales asociados a la esporulación por medio de la observación directa al microscopio óptico (1600x) siendo negativa en todos los casos. Lo anterior permitió plantear la ausencia de *B. thuringiensis*.

Se conoce que la superficie externa del grano de arroz (cáscara) está contaminada fuertemente con saprófitos adquiridos durante el desarrollo de la planta, además con otros contaminantes adquiridos del suelo, agua y aire. El secado del grano destruye la mayoría de los microorganismos aerobios, pero las esporas de *Bacillus spp.* son resistentes y sobreviven. El proceso de descascarado elimina la mayoría de la microflora externa, lo cual hace que el conteo microbiológico descienda de $2,5 \cdot 10^3$ CFU \cdot g⁻¹ a $2,5 \cdot 10^1$ CFU \cdot g⁻¹ según lo planteado por Sarrias y cols. al aislar *B. cereus* de arroz en grano con cáscara y sin cáscara, lo cual apoyó la idea de que el grano sin descascarar es el mejor sustrato para el aislamiento de esta bacteria en específico.⁷

Con el objetivo de evaluar el crecimiento de la bacteria en el arroz cocido y conservado a temperatura am-

biente por un lapso de tiempo prolongado, se realizó un conteo directo del número de microorganismos crecidos en placa, de las disoluciones de las muestras de arroz cocido tomadas en los tiempos señalados. Transcurridas las 24 h de incubación, se obtuvo un promedio de $2,6$ y $2,3 \cdot 10^6$ UFC \cdot g⁻¹ a las tres y ocho horas. No se observaron afectadas sus características organolépticas, lo cual coincidió con lo descrito por Cronin y cols.²¹ No se observaron diferencias significativas al evaluarlos estadísticamente. Se obtuvieron 9,1 y 13,7 % de aislados hemolíticos, así como 1,9 y 2,1 % lecitinasas positivos, ambos referidos al total de colonias contadas en placa (Tabla 3).

La proporción de bacterias hemolíticas aumentaron en el tiempo con respecto a la carga bacteriana total. Dentro de estas, las lecitinasas positivas mantuvieron una proporción constante, lo cual indicó que en el arroz cocido se produce un enriquecimiento de bacterias lecitinasas positivas (presuntas *B. cereus*) en el tiempo. El crecimiento a las tres horas, se puede explicar por la resistencia a la cocción que aporta a la bacteria la formación de la endospora, la cual a medida que desciende la temperatura y se crean las condiciones idóneas germina y comienza entonces a restablecer la población bacteriana. El continuo crecimiento notado a las ocho horas puede explicarse por la ventaja ecológica que tienen estas bacterias respecto a otras debido a la diversidad de enzimas hidrolíticas extracelulares que presentan, entre las que se encuentran las amilasas, muy importante en este tipo de sustrato rico en almidón.^{20,22}

Los aislados recogidos en ambos tiempos fueron considerados presuntos *B. cereus* y verificados mediante las pruebas fisiológicas, bioquímicas y morfológicas confirmativas. Se comprobó que de los 10 aislados, dos

Tabla 3. Cantidad de microorganismos encontrados en arroz cocido y conservado a temperatura ambiente a diferentes tiempos.

	Muestra del alimento (UFC · g ⁻¹)	Colonias hemolíticas (%)	Colonias lecitinasas positivas (%)
Muestra 1 (tres horas)	2,6 · 10 ⁶ n.s.	9,1*	1,9 n.s.
Muestra 2 (ocho horas)	2,3 · 10 ⁶ n.s.	13,7*	2,1 n.s.

n.s. No significativa estadísticamente (p > 0,05). * Diferencias estadísticamente significativas (p > 0,05).

no producían ácido a partir de la glucosa y otros dos tenían esporas que deformaban el esporangio por lo que fueron rechazados. Los seis aislados seleccionados resultaron bacilos Gram positivos, esporoformadores con un conjunto de características que los incluían en el grupo del *B. cereus*/*B. thuringiensis* al compararlos con la cepa control (Tabla 4) y confrontarlos con resultados de Priest y cols. y la información que ofrece el manual Bergey.^{13,15} Se observó ausencia de cuerpos parasporales, por lo que se consideró que los aislados eran de *B. cereus*,

Los resultados del antibiograma se revelaron según lo esperado, ya que resultaron resistentes a los antibióticos β-lactámicos y cefalosporinas y sensibles a los otros agentes antimicrobianos ensayados (Tabla 5). Lo anterior coincidió con los resultados de Whong y Kwaga, quienes encontraron igual patrón de resistencia en aislados de *B. cereus* obtenidos de diferentes tipos de alimentos en Nigeria.²³

Lo anterior confirma que las condiciones ambientales de la región oriental de Cuba, cuya temperatura oscila entre 29 y 33 °C son ideales, no solo para favorecer la contaminación del alimento con otras bacterias como se evidenció al registrar el incremento de bacterias hemolíticas, sino también, para el aislamiento de cepas de *B. cereus* de diferentes hábitat incluidos los alimentos, lo cual reveló la importancia que cobra la temperatura de conservación en cuanto a seguridad alimentaria se refiere. Agata y cols. (2002), establecieron una relación inversamente proporcional entre la temperatura de almacenamiento del arroz cocido y el tiempo en que aparece la toxina emética en el alimento. Afirmaron que a 35 °C, la toxina se puede detectar a las 4 h y que el conteo de las bacterias iguala o sobrepasa las 10⁶ UFC · g⁻¹.²⁴ En este trabajo, se comprobó que la cantidad de bacterias encontradas en el arroz cocido transcurridas las tres horas posteriores a su cocción resulta elevada, (alrededor de 2 · 10⁶). Se constató además, que las propiedades hemolíticas y fosfolípicas pueden servir como indicadores de su potencial toxigénico, lo cual coincide con lo reportado por Cronin, Agata y cols.^{21,24} Cronin y cols. además plantearon que el arroz mantenido más de cuatro horas a temperatura ambiente (> 10 °C) tras su elaboración, favorece la germinación de esporas y el crecimiento vegetativo de *B. cereus* hasta niveles peligrosos. Se conoce que en estas etapas es cuando se producen las toxinas responsables de los síndromes diarreico y emético (vómitos). Aunque en el trabajo no se exploró la posible existencia de la toxina emética, sí se puede considerar la posibilidad de que se comience a formar y almacenar en el alimento. Estudios realizados por Agata, Altayar, Carlin y otros revelaron que las variedades que producen esta toxina se concentran fundamentalmente en arroz y leche y no aparecen en otros alimentos y sugirieron además que los arrozales pudieran ser un área selectiva para el enriquecimiento del cultivo con las cepas eméticas y que las esporas de estas cepas al ser más resistentes al calor fueran seleccionadas durante la cocción.^{24,25,26}

Estos resultados correspondieron a estudios desarrollados con cepas aisladas de países de Europa y Asia, sin embargo, Ankolekar y cols. reportaron que el tipo de intoxicación más relacionada con el arroz en los Estados Unidos era la diarrea, como resultado de un estudio que abarcó varios tipos de alimentos y la posibilidad de que produjeran cualesquiera de los dos tipos de toxinas involucradas con estas enfermedades.²⁷ Lo anterior sugiere que pudiera haber un comportamiento de las variedades de *B. cereus* según el área geográfica, aspecto que hay que investigar más.

El crecimiento óptimo de *B. cereus* tiene lugar entre 28 y 35 °C, condiciones imperantes en países de clima templado y preferentemente tropical y las esporas de ciertas cepas poseen una resistencia inusual al calor y las radiaciones.^{6,28,29} Las esporas en dormancia son una etapa de supervivencia de la bacteria, desarrollada como una respuesta al estrés medioambiental. Aunque el calor puede inactivar fácilmente a las células vegetativas del microorganismo, las esporas son más resistentes a este agente físico. Cuando las esporas son reactivadas en un ambiente adecuado que contenga los nutrientes necesarios, muchas de ellas pueden germinar y revertir su estado de dormancia.

El arroz sin cocinar contiene endosporas de *B. cereus* que pueden germinar si el arroz es mantenido a temperatura ambiente luego de ser cocinado. El rápido recalentamiento antes del consumo no inactiva la toxina responsable del síndrome emético, si está presente, pues es termoestable y puede que no reduzca el número de bacterias por debajo de la dosis infectiva necesaria para causar el síndrome diarreico. Teniendo en cuenta la popularidad del consumo de arroz y que puedan producirse alteraciones en el tiempo y temperatura de cocción el estudio de esta bacteria en el producto se convierte en un asunto vital. Es imposible encontrar alimentos que no estén contaminados con esta bacteria debido a su naturaleza ubicua, por lo que se plantea que es muy posible la contaminación cruzada entre los alimentos y por ello, se recomienda ser muy cuidadoso cuando se expone el alimento entre 4 y 40 °C por más de 4 h.²⁷

La importancia de estos aislamientos está en que sientan las bases para investigaciones futuras, dirigidas a confirmar primero, que el arroz sin descascarar es una excelente fuente de aislamiento de *B. cereus* y segundo, que las cepas de esta bacteria que causan la intoxicación alimentaria con el arroz, se asocian a este cereal desde el campo donde haya sido cultivado, pues las condiciones ecológicas, así lo permiten, pasando por una serie de manipulaciones hasta llegar al mercado donde lo adquiere la población y que la forma de preparación y conservación posterior influyen decisivamente en la capacidad de este cereal para convertirse en un vehículo de enfermedades. Se sugiere realizar estudios posteriores para confirmar el vínculo entre las estirpes bacterianas aisladas del arroz cocido y el grano en cáscara.

Tabla 4. Características bioquímicas y degradativas de los diez aislados de arroz cocido mantenido sin refrigeración.

Pruebas bioquímicas y degradativas	Aislados ¹										<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778
Formación de ácido correspondiente a											
Glucosa	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
Arabinosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Manitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Xilosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Degradación de almidón	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Reducción de nitrato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

¹ De arroz cocido. + Positivo. - Negativo.

Tabla 5. Antibiograma de los aislados de arroz cocido mantenido sin refrigeración.

Antibióticos (µg)	Aislados Características						<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778
Penicilina 6	R	R	R	R	R	R	R
Cefotaxima 30	R	R	R	R	R	R	R
Cloranfenicol 30	S	S	S	S	S	S	S
Vancomicina 30	S	S	S	S	S	S	S

R Resistente. S Sensible.

CONCLUSIONES

El presente estudio evidenció el riesgo potencial que existe en el consumo de un arroz cocido después de transcurridas tres horas o más de su elaboración en las condiciones de temperatura de Cuba y otros países tropicales. En estos países, existe el nocivo hábito de consumir el arroz después de haber transcurrido largos periodos desde su elaboración, aspecto que debe discutirse para su consideración y modificación. *B. cereus* es una especie que recibe mucha atención, con la cual se puede aprender sobre la existencia de tipos virulentos y no virulentos. Esto puede revelar la naturaleza diversa de la bacteria, primariamente como saprófito del suelo con una fisiología bien adaptada para el tracto intestinal, además de actuar como patógeno oportunista involucrado en infecciones locales y sistémicas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Fritze D. Taxonomy of the Genus *Bacillus* and related genera: The aerobic endospore-forming bacteria. The Nature and application of biocontrol microbes: *Bacillus* spp. Symposium. 2004;94(11):1245-1248.
- Helgason E, Økstad OA, Caugant DA, Johansen HA, Fouet A *et al.* *Bacillus anthrax*, *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*-One species on the basis of genetic evidence. *App Environ Microbiol.* 2000;66(6):2627-2630.
- Arnesen LP, Fagerlund A, Granum PE. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol Rev.* 2008;32:579-606.
- Sanders ME, Morelli L, Tompkins TA. Sporeformers as human probiotics: *Bacillus*, *Sporolactobacillus* and *Brevibacillus*. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.* 2003;2:101-110.
- Hong HA, Duc LH, Cutting SM. The use of bacterial spore formers as probiotics. *FEMS Microbiol Rev.* 2005;29:813-835.

- Kramer JM, Turnbull PCB, Munshi G, Gilbert RJ. Identification and characterization of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species associated with foods and food poisoning. En: Corry JEL *et al*, editores. *Isolation and identification methods for food poisoning organisms.* Society for Applied Bacteriology, Technical Series No. 17. London: Academic Press: 1982:p.261-286.
- Sarrias JA, Valero M, Salmerón MC. Enumeration, isolation and characterization of *Bacillus cereus* strains from Spanish raw rice. *Food Microbiology.* 2002;19(6):589-595.
- Sarrias JA, Valero M, Salmerón MC. Elimination of *Bacillus cereus* contamination in raw rice by electron beam irradiation. *Food Microbiology.* 2003;20(3):327-332.
- Heinz DW, Essen LO, Williams RL. Structural and mechanistic comparison of prokaryotic and eukaryotic phosphoinositide-specific phospholipases C. *J Mol Biol.* 1998;275:635-650.
- Fanani ML, Maggio B. Kinetics steps for the hydrolysis of sphingomyelin by *Bacillus cereus* sphingomyelinase in lipid monolayers. *J Lipid Research.* 2000;41:1832-1840.
- Taylor AJ, Gilbert RJ. *Bacillus cereus* food poisoning: a provisional serotyping scheme. *J Med Microbiol.* 1975;8:543-550.
- Prescott H. *Laboratory Exercises in Microbiology.* 5th ed. New York: McGraw-Hill: 2002:p.37-61.
- Priest FG, Goodfellow J, Todd C. A numerical classification of the Genus *Bacillus*. *J General Microbiol.* 1988;34:1847-1882.
- Madigan MT, Martinko JM, Parker J. *Brock Biology of Microorganism.* Cap 21. 9th ed. New Jersey: Prentice Hall International: 2000:p.865-866.
- Bergey DH, Holt JG. *Bergey's Manual of determinative bacteriology.* 9th edition. Ed. Hensyl WR. New York: Lippincott Williams & Wilkins: 1994.
- Sharp RJ, Scawen MD, Atkinson T. Fermentation and downstream processing of *Bacillus*. En *Bacillus.* *Biotechnology Handbooks.* Vol 2. Ed Harwood CR. New York: Plenum Press: 1989:p.255-292.

17. Kotiranta A, Lounatmaa K, Haapasalo M. Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. *Microbes and Infection*. 2000;2:189-198.
18. Vilas-Boas G, Sanchis V, Lereclus D, Lemos MVE, Bourguet D. Genetic differentiation between sympatric populations of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *App Environ Microbiol*. 2002;68(3):1414-1424.
19. Yamada S, Ohashi E, Agata N, Venkateswaran K. Cloning and nucleotide sequence analysis of *gyrB* of *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides* and *B. anthracis* and their application to the detection of *B. cereus* in rice. *App Env Microbiol*. 1999;65(4):483-1490.
20. Priest FG. *Bacillus*. En: *Biotechnology*. Ed Rehm HJ, Reed G. Vol 1. Cap 11. Weinheim:VCH: 1993:p.367-400.
21. Cronin UP, Wilkinson MG. The growth, physiology and toxigenic potential of *Bacillus cereus* in cooked rice during storage temperature abuse. *Food Control*. 2009;20:822-828.
22. Fangio MF, Roura SI, Fritz R. Isolation and identification of *Bacillus* spp. and related genera from different starchy food. *J Food Sci*. 2010;75(4):M218-M221.
23. Whong CMZ, Kwaga JKP. Antibigrams of *Bacillus cereus* isolates from some Nigerian foods. *Nigerian Food Journal*. 2007;25(1):178-183.
24. Agata N, Ohta M, Yokoyama K. Production of *Bacillus cereus* emetic toxin (cereulide) in various foods. *Int J Food Microbiol*. 2002;73:23-27.
25. Altayar M, Sutherland AD. *Bacillus cereus* is common in the environment but emetic toxic producing isolates are rare. *J Appl Microbiol*. 2006;100:7-14.
26. Carlin F, Fricker M, Pielaat A, Heisterkamp S, Shaheen R *et al*. Emetic toxin-producing strains of *Bacillus cereus* show distinct characteristics within the *Bacillus cereus* group. *Int J Food Microbiol*. 2006;109:132-138.
27. Ankolekar C, Rahmati T, Labbé RG. Detection of toxigenic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* spores en U.S. rice. *Int J Food Microbiol*. 2009;128(3):460-6.
28. Setlow P. Mechanisms which contribute to the long-term survival of spores of *Bacillus* species. *J App Bact Symp*. 1994;76Supp.49S-60S.
29. Cronin UP, Wilkinson MG. *Bacillus cereus* endospores exhibit a heterogeneous response to heat-treatment and low temperature storage. *Food Microbiol*. 2008;25(2):235-243.