

Rev. Cienc. Tecnol.

Año 14 / N° 17 / 2012 / 5-8

Investigación sobre la presencia de *Bacillus cereus* en Yerba Mate elaborada

Analysis for the presence of *Bacillus cereus* in manufactured Yerba Mate

Jorge A. Duce, Sylvia A. Bordenave, Liliana, R. Ybarra

Resumen

En este trabajo se investigó la presencia de *Bacillus cereus* en yerba mate elaborada. El hábitat natural de este microorganismo es el suelo y se lo ha aislado de diferentes especies vegetales y sobre todo, de arroz hervido. El *Bacillus cereus* produce toxinas preformadas en el alimento de dos tipos, la termorresistente o emética y la termolábil o diarreaica.

Se analizaron 32 muestras de Yerba Mate elaborada, de diferentes marcas comerciales, 18 presentaron resultados positivos y 6 fueron confirmadas mediante pruebas bioquímicas y tipificadas. Las bacterias aisladas fueron remitidas al Instituto INEI-ANLIS Dr. Carlos Malbrán, para su tipificación y confirmación definitiva.

La presencia de *Bacillus cereus* en un alimento constituye un serio riesgo, sobre todo debido a la capacidad del mismo de producir toxinas que son termorresistentes.

En la bibliografía se presentan referencias a su aislamiento en vegetales secos, por ello no es de extrañar su presencia en Yerba Mate.

Palabras clave: patógenos; *Bacillus cereus*; yerba mate; presencia.

Abstract

In this work, the presence of *Bacillus cereus* in manufactured yerba mate was investigated. The natural habitat of this microorganism is the soil: it was isolated from different plant species, but above all, from boiled rice. *Bacillus cereus* produces toxins of two kinds preformed in food, one thermo-resistant or emetic and another thermolabile or diarrheogenic.

Thirty two samples of manufactured yerba mate of different trademarks were analyzed, out of which 18 presented positive results, 6 of which were confirmed by means of biochemical tests. The bacteria isolated were delivered to the Instituto INEI-ANLIS Dr. Carlos Malbrán for their typification and eventual confirmation.

The presence of *Bacillus cereus* in food constitutes a serious risk, above all due to its capacity to produce thermoresistant toxins. In the literature, reference to its isolation in dried vegetables was found, a reason for which its presence in yerba mate is feasible.

Key words: pathogens; *Bacillus cereus*; yerba mate; presence.

Introducción

Bacillus cereus ha sido implicado en toxiinfecciones alimentarias, particularmente asociado al consumo de arroz contaminado, y también en algunos procesos infecciosos en seres humanos y animales.

La calidad higiénico-sanitaria de Yerba Mate Elaborada (*Ilex paraguariensis* var. *St. Hilaire*) no está legislada en el Código Alimentario Argentino, solamente como para todos los alimentos, está reglamentado la ausencia de microorganismos patógenos [1].

Debido a las características de cultivo y cosecha [2] en las cuales el producto está en contacto con tierra y polvo, se consideró importante investigar la presencia en

Yerba Mate elaborada de *Bacillus cereus*, microorganismo Gram positivo, aerobio, mesófilo, esporulado, que tiene un hábitat de crecimiento en tierra. El mismo es productor de toxinas algunas de las cuales son termorresistentes. Este microorganismo produce dos tipos de toxinas preformadas, una de ellas termorresistente que tolera 126 °C durante 90 minutos, lo que constituye un riesgo importante para la salud debido a que la temperatura del agua a la que generalmente se toma el mate (entre 70° y 80 °C) no constituye una barrera para su destrucción. La bibliografía describe la presencia de esporos de *Bacillus cereus* en vegetales deshidratados, especialmente en especias y condimentos [3] [4] [5].

Las esporas de *B. cereus* son mucho más resistentes a la

radiación ionizante que las células vegetativas, requiriendo mayor cuidado en el diseño y evaluación de los experimentos y la aplicación de tecnología [6].

Materiales y métodos

Se analizaron 32 muestras de Yerba Mate elaborada de diferentes marcas comerciales adquiridas en comercios de la región. Se adoptó la metodología según FDA [7] y adaptada a los medios de cultivo utilizados [8].

Metodología experimental

Se tomó una unidad analítica de 25g de Yerba Mate elaborada y se realizaron diluciones en agua de peptona al 0,1%, las cuales fueron sembradas en superficie en el medio selectivo para *Bacillus cereus*.

En el medio de cultivo, el contenido de peptona es bajo (0.1%), y la adición de piruvato de sodio y emulsión de yema de huevo mejora el aislamiento y esporulación de esta bacteria. Para verificar la no utilización del manitol se usa un indicador de pH, azul de bromotimol.

El medio es selectivo, por el agregado del suplemento para *Bacillus cereus* con el que se obtiene una concentración final de 100 U de Polimixina B por mL de medio.

Las placas evidenciaron colonias típicas de *Bacillus cereus*, crenadas, filamentosas de aproximadamente 5 mm de diámetro a las 24 horas de incubación, y presentaron un color turquesa (peacock blue) rodeada por un precipitado de hidrólisis de yema de huevo; con centro grisáceo a las 48 horas de incubación.

El diagnóstico primario [9] se basó en la morfología y color de la colonia, en la precipitación de la lecitina hidrolizada y en la falta de utilización del manitol por *Bacillus cereus*.

Estos hallazgos diferencian *B. cereus* de *B. subtilis* y *B. licheniformis*, pero pueden no diferenciar *B. cereus* de otras especies de *Bacillus*, tales como *B. thuringiensis*, *B. anthracis*, *B. mycoides*, y en estos casos sería necesario realizar más ensayos para su identificación.

Las colonias típicas fueron identificadas mediante coloración, observación microscópica y pruebas bioquímicas (Voges Proskauer modificado para *Bacillus cereus*, citrato, licuefacción de la gelatina, catalasa y desarrollo en cloruro de sodio al 7%) [10].

Resultados

Los aislamientos positivos del género *Bacillus* en el medio selectivo fueron los correspondientes a las muestras 1, 2, 9, 10, 11, 14, 15, 17, 18, 19, 21, 22, 24, 25, 27, 29, 30, 31.

Las pruebas bioquímicas de los aislamientos efectuados dieron un perfil compatible con *Bacillus cereus*, para las pruebas de Gram (bacilos esporulados Gram +) catalasa, citrato, Voges Proskauer, gelatina y cloruro de sodio al 7% para las muestras 17, 19, 22, 24, 27 y 30.

Las colonias aisladas fueron tipificadas en el Instituto INEI-ANLIS Dr. Carlos G. Malbrán y los resultados fueron los siguientes:

- Cepa 17: *Bacillus firmus*
- Cepa 19: *Bacillus coagulans*
- Cepa 22: *Bacillus firmus*
- Cepa 24: Grupo *Bacillus subtilis*
- Cepa 27: Grupo *Bacillus cereus*
- Cepa 30: Grupo *Bacillus subtilis*

Discusión

La intoxicación alimentaria causada por *B. cereus* se produce debido a la ingestión de alimentos, cuyo contenido del microorganismo sea mayor a 10^5 unidades formadoras de colonia/gramo (ufc/g).

En el mundo entero, entre los años 1950 y 1976 se informaron 230 brotes de intoxicaciones alimentarias producidas por *B. cereus* cuya forma de presentación fue de tipo diarrea. Entre los años 1960 y 1968 *B. cereus* fue la tercera causa de intoxicación alimentaria en Hungría, con 117 brotes. Otros países fueron: Finlandia con 50 brotes, Holanda con 11 y Canadá con 9. Una amplia variedad de alimentos que incluyen sopas de vegetales, carne de pollo, vegetales, carne de vacuno, pastas, leche y helados estuvieron implicados.

Sobre la base de diversos estudios realizados en productos lácteos, se ha determinado un 27% de contaminación en leches en polvo, 52% en helados de máquina y 17% en leches fermentadas.

Si bien es cierto, que no hay estudios de prevalencia de contaminación por *B. cereus* en otro tipo de alimentos de alto riesgo, es importante mencionar que se ha detectado contaminación por este microorganismo en condimentos y especias [4].

A nivel internacional se han intensificado los estudios de microorganismos que tradicionalmente no se consideraban de importancia como agentes patógenos; como es el caso de *Bacillus cereus* y *Clostridium perfringens*, entre otros.

En trabajos internacionales [4] se reporta el aislamiento de *Bacillus cereus* en muestras deshidratadas de ajo en polvo, comino molido, laurel molido, orégano y pimienta negra. En valores que varían en recuentos de 100 ufc/g (orégano) a 160.000 ufc/g (comino molido).

Por otra parte, la Autoridad Europea de seguridad Alimentaria emitió un dictamen sobre *Bacillus cereus* y otros *Bacillus spp.* en productos alimentarios. En este dictamen llegó a la conclusión de que una de las principales

medidas de vigilancia consiste en controlar la temperatura y crear un sistema basado en los principios de análisis de peligros y puntos críticos de control [11]. En alimentos deshidratados, en los cuales es frecuente la presencia de esporas de *Bacillus spp.* patógenos puede aparecer *Bacillus cereus* al rehidratarlos con agua caliente. Algunos de estos alimentos deshidratados van destinados a consumidores potencialmente susceptibles. Por ello debe establecerse un criterio de higiene del proceso, además de las buenas prácticas destinadas a reducir la demora entre la preparación y el consumo.

Conclusión

En la actualidad estos microorganismos aparecen en los tres primeros lugares de importancia como agentes etiológicos de toxoinfecciones en aquellos países donde se estudia su presencia, como Canadá, Estados Unidos y países europeos [3].

Un trabajo de investigación reciente [4] en Cuba establece límites para *Bacillus cereus* en alimentos deshidratados del orden de 10^4 .

La presencia de *Bacillus cereus* y *Bacillus subtilis* en un alimento constituye un riesgo importante para la salud debido principalmente a la capacidad de los mismos de producir toxinas termorresistentes. La bibliografía señala que la dosis infectiva mínima necesaria para producir casos de intoxicación es de 10^7 ufc/g [12] la cual es muy difícil de encontrar en vegetales deshidratados como la Yerba Mate debido a su baja actividad acuosa.

Para Yerba Mate no hay registros de estudios de dosis infectiva mínima para este microorganismo, ya que este trabajo constituye un primer antecedente.

La Yerba Mate se emplea también en la preparación de una infusión conocida con el nombre de “mate cocido”, la que una vez preparada se consume parcialmente durante el día, en forma fría o caliente, por lo que el peligro se incrementa debido a que los esporos pueden desarrollarse durante el mencionado tiempo y producir las toxinas, hasta alcanzar las concentraciones consideradas de riesgo.

Existen trabajos sobre inactivación térmica de esporas de *Bacillus cereus* donde se demuestra que la temperatura de 55, 60 y 70 °C no es suficiente para su destrucción. Teniendo en cuenta que a esta temperatura se consume la infusión del mate cocido, se considera que debería estudiarse la forma de implementar un control exhaustivo para determinar la presencia de este microorganismo patógeno en Yerba Mate, con el objeto de prevenir posibles intoxicaciones, ya que los microorganismos del género *Bacillus* son capaces de vivir y proliferar en ambientes de elevada temperatura.

Se ha reportado que la temperatura óptima para inactivar las esporas es aproximadamente 90, 95 y 100 °C [13] y que el tratamiento térmico mínimo para productos

procesados (90, 95 °C por 6-10 minutos) usualmente no es suficiente para inactivar a todas las esporas [14].

Referencias

1. **Código Alimentario Argentino. Tomo 1 y 2.** Resoluciones del MERCOSUR anexas. Distribuidor de la Canal y Asociados. 1994.
2. **INTA Cerro Azul. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Estación Experimental Agropecuaria. Cerro Azul. 2007.** www.inta.gov.ar/mercedes/info/.../Manual%20INTAdeYerba.pdf
3. **Oviedo H., Pilar, Dra. (M. V.) Intoxicación alimentaria y *Bacillus cereus* Dto de Medicina Preventiva Animal Rev. Tecno Vet Año II. N° 1 Fac. de Cs. Veterinarias. Universidad de Chile. Marzo 1996.**
4. **Martino T.K; Leyva, V; Puig, Y; Machin, M; Aportela, N; Ferrer, Y. *Bacillus cereus* y su inocuidad en los alimentos.** Revista Cubana de Salud Pública. Ciudad de la Habana. V. 36 N°1 ISSN 0864-3466. Scielo. Parte I. 2010.
5. **Rey, Ana M. Y Silvestre, A. A. "Comer sin Riesgos 2".** Las Enfermedades Transmitidas por Alimentos. 2da edición. Editorial hemisferio Sur. 2005.
6. **Rossi, L; Watson, D; Escandarani, S; Miranda, A; Troncoso, A. *La radiación a la mesa.*** Radiation on the dining table. Revista Chilena de Infectología. Volumen 26. N° 4. Santiago de Chile. Agosto 2009.
7. **Food and Drug Administration. *Bacteriological Analytical Manual.*** Washington, D.C 2001.
8. **www.britanialab.com**
9. **Mac Faddin, Jean. *Pruebas Bioquímicas para la Identificación de bacterias de Importancia Clínica.*** Editorial Panamericana. 1980.
10. **Logan, N.A. and Turnbull P.C. *Bacillus and other aerobic endospore-forming bacteria,*** p.445-460. In P.R.Murray; E.J.Baron, J.H.Jorgensen, M.A.Pfaller and R.H.Yolken (ed.), *Manual of Clinical Microbiology.* ASM Press. Washington, D.C. 2003
11. **Seguridad alimentaria: una responsabilidad compartida. *Consejo Europeo de Información sobre la Alimentación.*** <http://www.eufic.org/article/es/page/BARCHIVE/expid/basics-seguridad-alimentaria/?lowres=1>

12. Landgraf, M.de Melo Franco; Gombossy B. D. *Microbiología dos alimentos*. Editorial Atheneu. Sao Paulo. Río de Janeiro. Belo Horizonte. 1999.
13. Byrne, B. Dunne, G. Bolton, D. *Thermal inactivation of Bacillus cereus and Clostridium perfringens vegetative cells and spores in pork luncheon roll*. *Food Microbiology* 23 pág.803-808. 2006.
14. Fernández, A. Collado, J.Cunha, L.M. Ocio, M.J. Martínez, A. *Empirical model building based on Weibull distribution to describe the joint effect of pH and temperature on the thermal resistance of Bacillus cereus in vegetables substrate*. *International Journal of Food Microbiology* 77,147-153. 2002.

Facultad Ciencias Exactas, Químicas y Naturales - UNaM. Jefe de Trabajos Prácticos, con dedicación exclusiva en las Cátedras de Microbiología de Farmacia; Biología General de la carrera de Licenciatura en Genética y Biología de la carrera de Ingeniería en Alimentos. Integrante Investigador categoría IV Programa Nacional de Incentivos. Decreto 2427/93. Función en Proyecto: Integrante. lybarra@fceqyn.unam.edu.ar

1. Laboratorio de Microbiología y Biotecnología "Dr. Fernando O. Benassi". Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Misiones. (joduce@fceqyn.unam.edu.ar) (sab@fceqyn.unam.edu.ar) (lybarra@fceqyn.unam.edu.ar)

Recibido: 07/05/2010.

Aprobado: 25/10/2011.

- Sylvia Alicia Bordenave¹
Profesora de Biología, Facultad de Humanidades, UNaM. (Universidad Nacional de Misiones). Licenciada en Genética, Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, UNaM. Especialista en Educación Superior, Facultad de Ingeniería, Oberá, UNaM. Cargo docente: Jefe de Trabajos Prácticos con dedicación exclusiva, en las Cátedras Microbiología General de la carrera de Ingeniería Química y Microbiología General y de los Alimentos de la carrera de Ingeniería en Alimentos. Integrante titular del Consejo Departamental de Ciencia y Tecnología de los Alimentos Participación en Proyectos de investigación. Investigador Categoría III del Programa de Incentivos de la Nación a los docentes investigadores, según Resolución Comisión Regional de Categorización: N°10-0250, Función en Proyecto: Co-directora. sab@fceqyn.unam.edu.ar
- Jorge Alberto Duce¹
Ingeniero Químico - Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Misiones (UNaM). Magister en Ciencia de los Alimentos Fac. de Cs. Ex. Qcas. y Nat. UNaM. Profesor Titular Dedicación Semiexclusiva en las Cátedra de Microbiología General de la Carrera de Farmacia y Microbiología General y de los Alimentos de la carrera de Ingeniería en Alimentos. Fac. de Cs. Ex. Qcas. y Nat. UNaM Resolución N° 050 del 24 de Marzo 1994 del Consejo Superior de la UNaM. Director Categoría III del Programa de Incentivos de la Nación a los docentes investigadores. Decreto 2427/93. Función en Proyecto: Director. joduce@fceqyn.unam.edu.ar
- Liliana Rosalba Ybarra¹
Licenciada en Genética - Facultad Ciencias Exactas, Químicas y Naturales Universidad Nacional de Misiones (UNaM). Maestrando de la Maestría en Tecnología de los Alimentos.