



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



INSTITUTO DE INGENIERÍA DE
ALIMENTOS PARA EL DESARROLLO

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

EVALUACIÓN DE RIESGOS SOBRE BACILLUS CEREUS EN ARROZ

TRABAJO FIN DE MÁSTER UNIVERSITARIO EN
GESTIÓN DE LA SEGURIDAD Y CALIDAD ALIMENTARIA

ALUMNO/A: FRANCESC MARTÍNEZ MARTÍNEZ

TUTOR/A ACADEMICO: ANTONIO MARTÍNEZ LÓPEZ

Curso Académico: 2019-2020

VALENCIA, 8/ 09/ 2020

ÍNDICE

RESUMEN / RESUM / ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	5
DESCRIPCIÓN DEL PELIGRO	7
CARACTERIZACIÓN DEL PELIGRO	9
• Síndrome emético	
• Síndrome diarreico	
EVALUACIÓN DE LA EXPOSICIÓN	11
• Medidas de control	
• Modelo predictivo	
• Resultados del modelo	
• Límites del modelo	
CONCLUSIONES	21
AGRADECIMIENTOS	22
REFERENCIAS	23

RESUMEN / RESUM / ABSTRACT

Resumen

El arroz es un alimento esencial en la dieta de muchos países y se usa como ingrediente en gran variedad de recetas. Este cereal debido a la forma en la que es producido, recolectado y procesado suele estar contaminado de *Bacillus cereus*, un organismo ubicuo que se encuentra principalmente en el suelo.

Debido a las adaptaciones sufridas por *B. cereus* hay cepas capaces de crecer a 4°C en platos con arroz una vez cocinado si este no se ha sometido a un tratamiento de esterilización comercial por la propiedad del microorganismo de producir esporas.

Se atribuyen dos enfermedades a este microorganismo. El síndrome emético, el cual es una intoxicación producida por ingerir la toxina emética preformada en el alimento y el síndrome diarreico, una infección al ingerir alimentos con una gran carga de células vegetativas o esporas que producen toxinas diarreicas durante su crecimiento en el intestino delgado.

Este trabajo es una revisión desde un punto de vista de la evaluación del riesgo que supone *B. cereus* para la salud de los consumidores.

Palabras clave: *Bacillus cereus*, riesgo, arroz, modelo predictivo

Resum

L'arròs es un menjar essencial en la dieta d'un gran nombre de països y s'utilitza com a ingredient en la preparació d'innumerables receptes. Aquest cereal per la forma en que es produït, recol·lectat i processat a sovint es troba contaminat de *Bacillus cereus*, un organisme ubic que es localitza fonamentalment al terra.

Per les adaptacions patides per *B. cereus* hi ha soques capaces de créixer fins a 4°C sobre l'arròs una vegada s'ha cuinat si aquest no pateix un procés d'esterilització comercial gracies a la seua capacitat per produir espores.

S'atribueixen dues malalties a *B. cereus*. El síndrome emètic, una intoxicació produïda per la ingesta de la toxina emètica preformada a l'aliment i una infecció produïda al menjar aliments molt contaminats de cèl·lules vegetatives o espores que alliberen toxines diarreiques a l'intestí prim durant el seu creixement.

Aquest treball es una revisió des d'un punt de vista de l'avaluació del risc que suposa *B. cereus* per a la salut dels consumidors.

Paraules clau: *Bacillus cereus*, risc, arròs, model predictiu

Abstract

Rice is a popular food worldwide and a staple food for the population of many countries. Used as an ingredient of many dishes, due to its cultivation, collection, and handling, are often contaminated with spores of *Bacillus cereus*, a ubiquitous microorganism found mainly in the soil.

Bacillus cereus has suffered many adaptations to the environment allowing it to grow under low temperatures such as 4°C, in foods containing rice unless these have been through commercial sterilization

Bacillus cereus produces two kinds of foodborne poisoning. The emetic syndrome, which occurs after the consumption of food containing the pre-formed emetic toxin and the diarrhoeal syndrome which is developed because of the growth and production of toxins in the small intestine by *B. cereus* if the food had high levels of contamination either of vegetative cells or spores.

This work is a review from the perspective of risk assessment of the risk for consumer's health that the contamination by *Bacillus cereus* supposes.

Keywords: risk, *Bacillus cereus*, rice, predictive model.

INTRODUCCIÓN

Bacillus cereus es un microorganismo importante en relación con las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA). Es una bacteria ubicua en el medio ambiente que se encuentra en gran variedad de suelos y aguas a través de los cuales pasa a multitud de alimentos y se incorpora así en la cadena alimentaria.

En 2018 estuvo relacionado con 98 brotes transmitidos por alimentos entre los países miembros de la Unión Europea, lo que representa un 1,9% de los brotes ocurridos durante este periodo. Un total de 1539 personas fueron afectadas en estos brotes de los cuales 111 fueron hospitalizados y una falleció (EFSA y ECDC, 2019). También se han reportado brotes en otros países causados por este patógeno, entre ellos un brote que afectó a 45 personas en un restaurante en Camberra (Australia) en 2018 (Thirkell *et al*, 2019), otro que afectó a 200 estudiantes en un colegio en China en 2018 (Chen *et al*, 2018).

Bacillus cereus está relacionado con dos tipos de enfermedades, una diarreica y otra emética. La enfermedad diarreica es una infección y está producida por el crecimiento del microorganismo en el intestino delgado, mientras que la enfermedad emética es una intoxicación alimentaria al consumir alimentos que contengan la toxina cereulida, la cual es producida por el microorganismo durante su crecimiento en el alimento contaminado (Martin *et al*, 2019).

El síndrome emético suele estar asociado a brotes donde los alimentos contaminados son platos de arroz o pasta, en especial platos donde el arroz se hierva en gran cantidad y se almacena para luego freírlo o recalentarlo a la hora de servir. Esta práctica permite que las células viables tras la cocción se reproduzcan durante el almacenamiento y produzcan la toxina cereulida, que al ser termoestable no se destruye durante la posterior fritura o recalentado del arroz (Kramer y Gilbert, 1989).

Recientemente las exigencias de los consumidores de alimentos refrigerados poco procesados de vida útil limitada están llevando a un incremento de los brotes por *B. cereus* tal y como lo ha reconocido la EFSA y la ECDC (2019).

B. cereus se encuentra entre las 10 parejas patógeno/alimento que producen un mayor número de ETA entre los miembros de la Unión Europea en 2018. Generalmente está asociado a alimentos con distintos ingredientes entre los que se encuentra el arroz, u otros productos derivados del arroz como la pasta o los fideos (Maria *et al*, 2006).

Los brotes de toxiinfecciones causadas por *B. cereus* se deben gran parte de las veces al consumo de arroz contaminado con esporas o células vegetativas (Gilbert *et al.*, 1974). Cerca del 95% de los casos de la enfermedad emética se deben al consumo de arroz (Hocking, 2003). En concreto se le relaciona con el consumo de arroz chino frito (Little *et al.* 2002, Lake *et al.* 2004), y esto se debe a que suelen preparar arroz hervido en grandes cantidades que almacenan y terminan de cocinar o recalientan en respuesta a las comandas de los clientes. Si bien esta práctica es logísticamente interesante para que sea segura el alimento se ha de almacenar por debajo de 7°C o por encima de 63°C, temperaturas límite para la germinación de las esporas (Bilung *et al.* 2016). Estos autores observaron que en 40 muestras de arroz chino todas presentaban concentraciones de *B. cereus* superiores a 10³ UFC/g. De forma similar Ankolekar *et al.* (2009) encontraron que 94 muestras de un total de 178 de arroz procedente de los Estados Unidos estaban contaminadas con *B. cereus*. En un trabajo similar, Yu *et al.* (2020) detectaron 302 de 860 muestras de comidas listas para tomar contaminadas con *B. cereus* con un 10% de esas muestras superando 1100 MPN/g. Trabajos equiparables han sido llevados en restaurantes iraquíes donde 10 de las 16 muestras presentaron concentraciones de *B. cereus* entre 1.6·10² -4,6·10³ UFC/g (Ahmed, 2017).

Estos estudios ilustran la ubicuidad del microorganismo y lo generalizada que puede ser su presencia en el arroz. Los distintos tipos de arroz suelen presentar concentraciones diferentes de microorganismos siendo estas mayores en el arroz integral que en el blanco por el procesamiento que se le hace a cada uno (Sarrias *et al.* 2003).

El arroz es el grano de una planta herbácea del género *Oryza* que se ha cultivado desde hace más de 8000 años y que en la actualidad es principalmente para consumo humano y en casos de cosechas de mala calidad como alimento para ganado. Es un alimento básico para más de la mitad de la población mundial y especialmente para países en vías de desarrollo. Este cereal se comercializa de varias formas, integral, vaporizado, precocido, molido como harina. Cada tipo de arroz presenta un riesgo diferente que dependerá del tratamiento que haya recibido durante su procesado y del uso que le vaya a dar el consumidor.

El arroz presenta un pH cercano a 7 y está constituido por 79% carbohidratos, 7% proteína, 2% grasa, 3% fibra, además de vitaminas y minerales. Esta composición le permite actuar como un excelente medio de cultivo una vez es cocinado y tiene la humedad suficiente. Las células vegetativas de *B. cereus* no pueden crecer sobre el arroz crudo por la baja humedad del grano, sin embargo, pueden sobrevivir durante 48 semanas en temperaturas de refrigeración o en lugares secos. La viabilidad del patógeno

se reduce hasta unas 16 semanas si se almacena a temperaturas superiores a 45°C con una $a_w=0,78$ (Jaquette y Beuchat. 1998)

El principal problema que supone la contaminación con *B. cereus* es la presencia de esporas termoresistentes que pueden sobrevivir las condiciones de la cocción que suele ser unos 15 minutos a 100°C (Gilbert *et al.* 1974). Los estudios indican que durante el cocinado del arroz se producen entre 2 y 3 reducciones decimales de las esporas presentes de forma que el riesgo del producto cocinado depende enormemente de la concentración inicial y las medidas higiénicas en la manipulación del alimento (Christina *et al.* 2002). Después de la cocción las esporas restantes siguen siendo capaces de germinar y crecer hasta 10^7 - 10^9 UFC/g tras 24 horas a 26 o 32 °C respectivamente (Shelef y Liang 1982, Harmon and Kautter 1991).

El objetivo de este trabajo es hacer una revisión del problema actual que supone la presencia de *B. cereus* en el arroz y sus derivados desde el punto de vista de una evaluación industrial del riesgo microbiológico, desarrollando un modelo de evaluación de la exposición útil para evaluar y en su caso ayudar a reducir el riesgo de la presencia de microorganismos en estos alimentos.

DESCRIPCIÓN DEL PELIGRO

El grupo *Bacillus cereus* “*sensu lato*” son ocho bacterias con una relación taxonómica ambigua que incluye las especies causantes de ETA: *B. cereus* y *B. weihenstephanensis*; además de *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. thuringiensis*, *B. cytotoxicus*, and *B. toyonensis* y *B. anthracis*. Las similitudes fenotípicas y genéticas hacen difícil su diferenciación mediante pruebas bioquímicas (Martínez *et al.* 2011)

Dentro de este grupo, *B. cereus* “*sensu stricto*” es la especie más implicada en brotes (Pirhonen *et al.* 2005). *Bacillus cereus* es una bacteria Gram-positiva, aerobia facultativa, esporulada. Sus esporas les confieren resistencia a condiciones ambientales extremas tales como calentamiento, congelación, desecación e irradiación; algunas de sus cepas presentan flagelos peritricos que les confieren movilidad (Bottone. 2010, Sarrias *et al.* 2003). Pese a ser microorganismos patógenos, algunas cepas se consideran beneficiosas y son usadas como probióticos (Gil-Turnes *et al.* 1999) o como promotores del crecimiento en plantas (Halverson y Handelsman. 1991).

La temperatura óptima de crecimiento de *B. cereus* se encuentra entre 30 y 40°C aunque algunas cepas pueden crecer a 55°C. Algunos trabajos

indican que las cepas responsables del síndrome emético presentan una temperatura mínima de crecimiento de 15°C (Finlay y Logan. 2002). Otras cepas psicrótrofas o psicotolerantes aisladas de productos lácteos se han adaptado a estas condiciones y presentan tolerancia a temperaturas de 4 a 7°C (Kotiranta y Lounatmaa. 2000).

Bacillus cereus tolera valores de pH en el intervalo 4,5-9,5 (Finlay *et al.* 2002), sin embargo, una concentración de ácido acético superior a 0,1% inhibe su crecimiento. El intervalo de pH óptimo es de 6 a 7 y su tolerancia a estrés por cambios en el pH incrementa en condiciones anaeróbicas.

Las células vegetativas mueren cuando el pH baja de 4,3, aunque hay cepas que presentan gran tolerancia a los ácidos gástricos si en etapas previas a la digestión han sido sometidos a un estrés por pH ácido (Clavel *et al.* 2004). Esto coincide con el hecho de que el arroz está relacionado mayoritariamente con el síndrome emético, pues al ser un alimento con un pH cercano a la neutralidad las células vegetativas son más sensibles a los ácidos del estómago durante la digestión. Por otra parte, las esporas presentan una gran tolerancia a los cambios en el pH siendo viables entre pH 1-9 (Clevel *et al.* 2004). Estas si pueden sobrevivir en el estómago para luego germinar en el intestino delgado, reproducirse y provocar el síndrome diarreico.

El crecimiento óptimo se da en presencia de oxígeno, aunque puede crecer en anaerobiosis, pese a que en este ambiente no se detecta producción de toxinas (Finlay *et al.* 2002). Las células vegetativas requieren una actividad de agua (a_w) entre 0.912 y 0.950 para crecer (Mols *et al.* 2009).

Bacillus cereus produce dos tipos de toxinas causantes del síndrome emético y diarreico. La toxina diarreica es producida por las esporas que germinan en el intestino delgado durante su etapa de crecimiento exponencial (Granum y Lund. 1997).

La toxina emética llamada cereulida se produce en la fase de crecimiento exponencial de *B. cereus* en el alimento, en presencia de oxígeno y en condiciones de pH, a_w y temperatura adecuadas (Agata *et al.* 1995). Agata *et al.* (2002) estudiaron la producción de cereulida por *B. cereus* en arroz. En este trabajo almacenaron arroz hervido a diferentes temperaturas demostrando que a mayor temperatura de almacenamiento el crecimiento del microorganismo era más rápido y la toxina se producía antes, aunque la producción de dicha toxina no aumentaba de forma proporcional al crecimiento de la bacteria. Los resultados fueron similares para arroz hervido y frito almacenado durante 24h a 30°C.

Los platos elaborados con arroz gracias a sus características químicas sirven como un medio de crecimiento excelente y permiten el crecimiento de *B. cereus*.

Las esporas de *B. cereus* pueden sobrevivir al proceso de cocción al que se suele someter el arroz, sin embargo, hay una alta heterogeneidad en la resistencia térmica de las esporas. Fernández *et al* (1999) determinaron valores de D entre 0.94 y 11 min a 95°C y 0.22 y 2.5 min a 100°C en agua doble destilada. En otros trabajos como el de Penna y Moraes (2002) se obtuvo un valor de D de 3,5 min a 97,8°C. Estos valores nos indican que para un tratamiento estándar de cocción durante 20 min a 100°C habrá una reducción en el número de esporas viables, pero no será muy elevada. Las esporas viables restante tras un largo periodo de almacenamiento, aunque sea a bajas temperaturas, germinarán y habrá un crecimiento mínimo, el cual incluso a una temperatura de 8°C se pueden alcanzar concentraciones de 10^4 a 10^8 UFC/g (Ultee *et al.* 2000)

CARACTERIZACIÓN DEL PELIGRO

Bacillus cereus produce dos tipos de toxinas que producirán los dos síndromes asociados a este microorganismo. Un tipo son las toxinas responsables del síndrome diarreico, estas son tres toxinas denominadas, enterotoxina no hemolítica (NHE), hemolisina BL (HBL) y la citotoxina K (cytK) (EFSA. 2016, Granum y Lund. 1997, Jung-Beong *et al.* 2010). Para que estas puedan causar la enfermedad han de producirse en el intestino delgado, generalmente en consecuencia al consumo de alimentos contaminados con gran cantidad de esporas o células vegetativas. Esto es debido a que dada su estructura son sensibles a los tratamientos térmicos y se eliminan en el cocinado previo al momento de su consumo. Es suficiente un tratamiento a 56°C durante 6 minutos para desnaturalizar este tipo de toxinas (MPI. 2015). El síndrome causado por la toxina diarreica se caracteriza por dolor abdominal y diarrea líquida entre 8 a 16 horas después de la ingesta (Anna *et al.* 2019).

La otra toxina producida se llama cereulida. Es un dodecapéptido cíclico formado por tres repeticiones de la secuencia d-O-Leu--d-Ala--l-O-Val--l-Val y su secuencia está codificada en un el megaplásmido del tipo pOX1, similar al que codifica la toxina de *Bacillus anthracis* (Alonzo *et al* 2015). Esta, al contrario de la toxina diarreica produce la enfermedad al sintetizarse durante el crecimiento de *B. cereus* en el alimento e ingerirse posteriormente por el consumidor, ya que los tratamientos posteriores al primer cocinado son insuficientes para inactivarla. Esta toxina puede soportar tratamientos de 90

minutos a 126°C (FSAI. 2016). Los síntomas del síndrome emético son náuseas, vómitos y dolor de cabeza que ocurren entre 1 y 5 horas después del consumo de alimentos en contaminados con la toxina. Es esta ETA la que se encuentra más relacionada con el consumo de cereales y en especial arroz (Berthold-Pluta *et al.* 2015, Ehling-Schulz *et al.* 2015).

Se realizaron en el pasado estudios en humanos en los que debido a la levedad de los síntomas no se pudo determinar una dosis respuesta con suficiente apoyo estadístico para ninguno de ambos síndromes producidos por *B. cereus* (Hauge. 1955, Dack *et al.* 1954). Sin embargo, en la mayoría de los brotes a nivel mundial las concentraciones del microorganismo en los alimentos implicados eran superiores a 10^5 UFC/g.

Síndrome diarreico

El síndrome diarreico es un caso de toxiinfección alimentaria. Como se ha comentado anteriormente las evidencias indican que la dosis infectiva mínima de *B. cereus* para causar esta enfermedad es superior a 10^5 UFC/g (Schoeni y Wong. 2005; Notermans *et al.* 1997, Granum y Baird-Parker. 2000). Kramer y Gilbert (1989) determinaron que las concentraciones de *B. cereus* presentes en los alimentos recuperados de brotes del síndrome diarreico se encuentran casi siempre en el rango de 5×10^5 to 9.5×10^8 CFU/g. Los síntomas de esta enfermedad incluyen además de los anteriormente mencionados, dolor abdominal y diarrea líquida; tenesmo rectal, náuseas moderadas y ausencia de fiebre. Estos síntomas aparecen entre 6 y 15 horas después de la ingesta y pueden persistir durante 24 horas. Los síntomas son leves y parecen los síntomas de la infección por *Clostridium perfringens*, por esto y debido a que la enfermedad es autolimitante se encuentra infraestimada en los informes epidemiológicos (Tajkarimi. 2007).

Síndrome emético

El síndrome emético se da cuando el consumidor ingiere la toxina cereulida preformada en el alimento. Para que esto ocurra es necesario concentraciones del orden de 10^5 a 10^8 UFC/g de modo que la cantidad de toxina sea suficiente para desarrollar la enfermedad (Tajkarimi. 2007). Pese a que los alimentos sean recalentados o procesados antes de su consumo y se eliminen las células vegetativas la toxina emética es termoestable y no se logra su eliminación. En este caso la dosis infectiva es indiferente pues el agente causal es la toxina y su concentración no tiene por qué coincidir con la del microorganismo en el momento de la ingesta. En un brote ocurrido en

Finlandia en 2005 se determinaron concentraciones de 1,6 µg/g en los alimentos implicados. Suponiendo que las raciones fueran de 300g la dosis tóxica de la cereulida podría estar alrededor de 450 µg/g (Pirhonen *et al.* 2005). En otro brote sucedido en los Países Bajos las concentraciones de la toxina en los alimentos variaron entre 0,03-13,3 µg/g. Los síntomas de esta enfermedad que ya han sido mencionados anteriormente pueden confundirse con los de una infección por *Staphylococcus aureus* (Tajkarimi. 2007).

EVALUACIÓN DE LA EXPOSICIÓN

El suelo es la principal fuente de contaminación de esporas de *B. cereus* aunque se ha encontrado en alimentos concentraciones ente 10^3 y 10^5 esporas por gramo (Guinebretiere *et al.* 2003, EFSA. 2005). Posteriormente el producto puede contaminarse durante el procesado, puesto que las esporas tienen grandes propiedades adhesivas y cuentan con la capacidad de formar biofilms en las superficies de los equipos (Jullien *et al.* 2002). Este microorganismo se encuentra frecuentemente como esporas en alimentos listos para el consumo, puesto que las células vegetativas se eliminan durante mediante tratamientos térmicos durante el procesado. Es por tanto que el almacenamiento posterior puede permitir a las esporas germinar y crecer hasta niveles en los que se considere un riesgo si las condiciones de almacenamiento son inadecuadas (EFSA. 2005).

Las nuevas tecnologías de procesado y de barreras (altas presiones hidrostáticas, tratamientos con campos eléctricos, cocinado en frío, entre otras) sitúan a *Bacillus cereus* como un riesgo emergente, ya que estos tratamientos son incapaces de eliminar las esporas completamente y estas pueden germinar y crecer incluso a temperaturas cercanas a 10°C o inferiores.

La incidencia de brotes causados por *B. cereus* está ligada a las condiciones de almacenamiento, es decir la temperatura y el tiempo transcurrido desde que se cocina el arroz hasta que finalmente se sirve. Las estrategias para prevenir estos brotes se centran en reducir la concentración inicial de microorganismos, las medidas de control necesarias para asegurar la destrucción de los patógenos y disminución de la carga microbiana y por último el control de las condiciones de almacenamiento para evitar su crecimiento (Tessi *et al.* 2002).

Las intoxicaciones alimentarias por *B. cereus* suelen ocurrir en restaurantes y servicios de catering y generalmente son debidos a errores en

la refrigeración y/o el retraso entre la preparación y la entrega del plato (EFSA. 2005).

Los estudios realizados sobre muestras de arroz crudo demuestran cómo de extendido está este patógeno. En un estudio realizado en Argentina el 2010 observaron que el 100% de las muestras analizadas presentaban *B. cereus* (Fangio *et al.* 2010). Otro estudio realizado en Colombia encontró que de 244 muestras analizadas cerca del 12% presentaban concentraciones superiores a 10^4 UFC/g, concentración considerada límite según diversos organismos de control (UERIA. 2011).

Platos que contengan arroz pueden ser también una fuente de intoxicación o de riesgo. Diversos estudios realizados en restaurantes de Estados Unidos y Reino Unido observaron que puede haber contaminación cruzada durante la preparación de los platos por malas medidas de higiene en el trabajo (Bryan *et al.* 1981). En Reino Unido los estudios indican que el riesgo es mayor para pequeños restaurantes que para grandes cadenas, principalmente por los esfuerzos que invierten estas compañías en la formación en higiene de sus empleados y la velocidad a la que se sirven los alimentos una vez preparados (Nichols *et al.* 1999).

Puesto que es imposible evitar la presencia de *B. cereus* en la mayoría de los alimentos es importante contar con medidas de control específicas que reduzcan el riesgo a niveles tolerables.

Medidas de control

Algunas medidas de control dirigidas a prevenir la germinación y limitar el crecimiento de *Bacillus cereus* se centran en la temperatura, el pH, la a_w , compuestos antimicrobianos, cloruro de sodio y atmósferas modificadas.

La refrigeración reduce el crecimiento de *B. cereus* aumentando su tiempo de generación. Chroma *et al* (2000) descubrieron que el tiempo de duplicación de 5 cepas de *B. cereus*, incluyendo cepas psicrófilas y mesófilas aumentaba según disminuía la temperatura del medio. La duración de la fase de latencia también aumenta cuando se reduce la temperatura (Valero *et al.* 2000). Se considera que la refrigeración es el mejor método para prevenir el crecimiento de *B. cereus* siempre que se mantenga una temperatura inferior a 4°C.

El pH de los alimentos puede condicionar el crecimiento de *Bacillus cereus* el cual no es especialmente tolerante a pH ácido. Lindsay *et al* (2000) indicaron que a una temperatura estándar de 25°C el crecimiento de este microorganismo se mantiene prácticamente constante entre pH 5.5 y 7 pero

que se reduce drásticamente al disminuir de este valor. Sin embargo, el pH del arroz cercano a la neutralidad le permite actuar como un buen sustrato.

Por lo que respecta a la a_w esta limita el crecimiento de *B. cereus*, así como de muchas otras bacterias ya que la mayoría son sensibles a esta característica del medio. Esta ha de ser superior a 0.92 para permitir el crecimiento de *Bacillus cereus* (Kramer y Gilbert. 1989). Relacionado con este punto, se puede adicionar NaCl para reducir la disponibilidad de agua y limitar el crecimiento, sin embargo, la EFSA (2005) publicó una opinión donde califica de inconsistentes los resultados al respecto. Minhui *et al* (2017) realizaron un estudio donde compararon el efecto de concentraciones entre 2-15% en el crecimiento de *B. cereus* en gambas saladas donde los resultados fueron similares para todas las concentraciones de NaCl.

Los envases con atmósfera modificada se basan sobre todo en el efecto antimicrobiano del CO₂ sobre los microorganismos. Se ha observado que concentraciones de CO₂ superiores al 40% limitan el crecimiento de *B. cereus* a 8°C, temperatura a la que cepas psicrotrofas podrían crecer en condiciones normales (Bennik *et al.* 1995, Samapundo *et al.* 2011). Pese a que un único tratamiento no inhibe el crecimiento de *B. cereus* la combinación de anaerobiosis, concentraciones elevadas de CO₂ y temperaturas de refrigeración adecuadas si se puede evitar su crecimiento (Webb *et al* 2019).

Las tecnologías de preservación pueden ayudar a prevenir la presencia de *Bacillus cereus* en alimentos. La inactivación térmica es la medida de control más común para inactivar células bacterianas vegetativas, sin embargo, los procesos típicos de cocinado fallan en inactivar las esporas de *B. cereus* por su elevada tolerancia a altas temperaturas. Fernández *et al* (1999) calcularon un valor de D_{105°C} de 0.63 minutos en esporas aisladas de la superficie de vegetales. Posteriormente el mismo grupo detectó que la sensibilidad de las esporas a la temperatura puede aumentarse reduciendo el pH del medio (Fernández *et al.* 2002).

El efecto de tratamientos no térmicos ha sido estudiado por distintos autores. Knorr (1955) indica que son necesarios valores muy elevados de altas presiones hidrostáticas para inhibir las esporas bacterianas. Otras tecnologías como la de campos eléctricos pulsados no inactiva tampoco las esporas (Ruiz *et al.* 2003). Estos tratamientos si se han mostrado eficaces si se promueve la germinación de las esporas antes de realizarlos (Raso *et al.* 1998, Ruiz *et al.* 2003, Margosch *et al.* 2004). Collado *et al* estudiaron el efecto de diferentes concentraciones de L-alanina en las cinéticas de germinación de una cepa de *B. cereus* aislada de un huevo como tratamiento previo a un proceso térmico. Estos son tratamientos interesantes, aunque hay que tener en cuenta que habrá una fracción de esporas durmientes que no germinarán y seguirán suponiendo un riesgo para el consumidor.

El plasma es ampliamente considerado un método eficaz de descontaminación y está aumentando su uso en la industria alimentaria (Liao *et al.* 2019). Yan *et al* recientemente (2020) han estudiado el efecto de esta tecnología para inactivar esporas de *Bacillus cereus*. Los resultados muestran una reducción de 1.62-2.96 log UFC/g de una concentración inicial de 10^6 UFC/g. Liao *et al* (2020) también estudiaron el efecto de agua activada por plasma, en este caso combinado con un tratamiento térmico moderado para la descontaminación de esporas de *B. cereus* en arroz. Los resultados fueron una reducción de 1.54-2.12 log UFC/g tras 60 minutos de exposición.

Otra tecnología que demuestra ser efectiva contra las esporas bacterianas es la irradiación. Las esporas de *B. cereus* tienen una resistencia a la irradiación similar a las de *C. perfringens*. La dosis necesaria para reducir un orden de magnitud es cerca de 1.6kGy (WHO. 1999). Pese a los resultados de esta tecnología su uso no está muy generalizado debido a la mala aceptación de los consumidores.

El uso de aditivos como la nisina permite la inactivación de células vegetativas, mientras que otros como el carvacrol no tienen apenas efecto (Ray. 1992, Pol y Smith. 1999, Periago y Moezelaar. 2001). María *et al* (2006) estudiaron el efecto inhibitorio de la enterocina AS-48 sobre cepas toxigénicas de *Bacillus cereus* en alimentos derivados del arroz. Los autores encontraron que la sensibilidad de las esporas a los tratamientos térmicos aumentaba con la adición de este compuesto, consiguiendo la inactivación de estas con tratamientos de 1 minuto a 90°C sobre arroz hervido o 95°C en el caso de gachas.

Modelo predictivo de *B. cereus*

Teniendo en consideración el comportamiento del *Bacillus cereus* en la cadena alimenticia y su respuesta a los factores medioambientales(calor, temperatura de refrigeración, entre otros), es importante para los operadores económicos contar con un modelo de evaluación de la exposición que permita predecir el número de microorganismo más probable que se puede encontrar en una porción de alimento en el momento de su fabricación así como el que pueda haber a la hora de su consumo, Esta es la forma de garantizar que el producto es inocuo en el momento del consumo.

Para ello hemos construido un modelo modular para simulación Monte Carlo que consiste en un primer módulo donde se calcula el número final de microorganismos para una temperatura y un tiempo de cocción determinados, introduciendo como parámetros el valor de termorresistencia D del microorganismo a una temperatura de referencia de 95 °C y el valor Z

del microorganismo, así como el número inicial que contamina la porción de alimento. Este módulo se desarrolla con el modelo de Bigelow, como modelo cinético, (1), a partir de los datos obtenidos en un experimento de inactivación térmica en tubos capilares.

A continuación, se desarrolla un módulo de crecimiento donde partiendo del número final de microorganismos después del proceso de cocción, la velocidad específica de crecimiento del *Bacillus cereus* y el factor de latencia dicho microorganismo en un medio de referencia se obtiene una estimación del número de microorganismos más probable después de un tiempo de almacenamiento a una temperatura dada. Este módulo se desarrolla considerando el modelo de crecimiento de Baranyi como modelo cinético (2)

$$\text{Log}D = \text{Log}D^* - (1/z) (T - T^*) + \varepsilon \quad (1)$$

- D: Tiempo de reducción decimal.
- D*: Tiempo de reducción decimal a temperatura y pH de referencia.
- T: Temperatura.
- T*: Temperatura de referencia.
- Z_T: Valor z

$$y(t) = y_o + \mu_{\max} A(t) - \frac{1}{m} \ln \left(1 + \frac{e^{m\mu_{\max} A(t)} - 1}{e^{m(y_{\max} - y_o)}} \right) \quad (2)$$

- Y₀: Logaritmo de la concentración de células a tiempo 0.
- y_{max}: Logaritmo de la concentración máxima de células.
- m: Parámetro de curvatura.
- A(t): Función del retraso gradual en el tiempo.

Dada la relevancia que supone la contaminación de *B. cereus* en concreto para alimentos listos para su consumo y restaurantes pequeños se ha analizado el efecto que tienen la temperatura y el tiempo de cocción, la concentración inicial y el tiempo y temperatura de almacenamiento sobre la concentración final de este microorganismo.

En la tabla 1 se indican las funciones de distribución utilizadas para hacer la simulación Monte Carlo y determinar el número total más probable de microorganismos que se pueden encontrar en el arroz después de haber recibido un proceso de cocción por calor y estar almacenado un determinado tiempo a una temperatura de refrigeración.

Las funciones de distribución para el valor de D y de z se obtuvieron después de utilizar la herramienta *Bestfit* proporcionada por el programa *Simular*, sobre datos experimentales. Este programa es el que se ha utilizado para llevar a cabo la Simulación Monte Carlo. Las funciones de distribución para el número inicial antes de la refrigeración y el número total final se obtuvieron de la bibliografía.

Datos cinéticos				
Temp ref (°C)	D a Tref (min)		z (°C)	
95	Media	DS	Media	DS
	0,953696025	0,020348369	8,130138622	0,026439615
	0,946087039		8,174323705	
Datos del medio				
N0	Temp (°C)		tiempo (min)	
7,000E+03	90		6	
Cálculos				
Dt (min)	Media (N1)	DS (N1)	N1	
3,86903349	1,969E+02	13,8345444	207,8258892	

FIGURA 1. Modulo de inactivación del modelo de evaluación a la exposición.

Datos cinéticos			
Mu		Lambda	
0,01578338		92,58699737	
Datos del medio			
N1	Temperatura (°C)	tiempo (h)	
197,8132758	5	100	
InN/N1	Media (N2)	DS (N2)	N2
0,643470373	376,4532641	18,43814207	363,913963

FIGURA 2. Modulo de crecimiento del modelo de evaluación a la exposición.

La herramienta *Simular* es un *plug-in* para Excel que permite llevar a cabo Simulaciones Monte Carlo, es de libre acceso y su desarrollo está enfocado a la evaluación de riesgos en finanzas, sin embargo, ha mostrado ser perfectamente adecuado para hacer Simulación Monte Carlo en la evaluación de riesgos microbiológicos en alimentos.

Tabla 1: Funciones de distribución de distintos parámetros del modelo

Parámetro de entrada/salida	Función de distribución
Valor D (min)	Normalsim(0.95; 0.020)
Valor z (°C)	Normalsim(8.1; 0.026)
Numero inicial para refrigeración (log UFC/g)	Normalsim(C13;D13)
Número final total (inactivación+ refrigeración) (logUFC/g)	Normalsim(C31;D31)

13, D13, C31, D31 son cálculos intermedios y corresponden a casillas de Excell del programa SimulAr.

Se han realizado 1000 iteraciones para diferentes temperaturas y tiempos de cocinado para determinar las concentraciones de *B. cereus* en el alimento tras su elaboración y posteriormente se ha realizado el mismo número de iteraciones para diferentes tiempos y temperaturas de almacenamiento a partir de las concentraciones obtenidas de las iteraciones anteriores.

Resultados del modelo

El modelo se ha validado con datos independientes y el resultado se puede apreciar en las tablas 1 y 2. Sobre estos valores se calcularon el factor de exactitud y el BIAS cuyos resultados fueron 1,09 y 1,01 para el módulo de inactivación y 1,13 y 0,97 para el de crecimiento. Estos factores informan sobre la diferencia entre los valores experimentales y los predichos, siendo iguales a 1 cuando no hay diferencia entre estos.

TABLA 1. Validación del módulo de inactivación

Condiciones			N ₁ Experimental	N ₁ Predicho
N ₀ (UFC/g)	Temperatura (°C)	Tiempo (h)		
67000	85	30	1000	968,4
87500	90	9	515	413,5
75500	95	1,5	1720	2292

TABLA 2. Validación del módulo de crecimiento

Condiciones			N ₂ Experimental	N ₂ Predicho
N ₁ (UFC/g)	Temperatura (°C)	Tiempo (h)	Log10	Log10
2292	5	40	3,45	2,22
2292	15	40	3,78	4,23
2292	20	100	6,47	7,61

Los resultados obtenidos por el modelo indican que el cocinado normal del arroz a 95-100°C durante 15-20 minutos es suficiente para mantener seguro el alimento incluso con las cargas iniciales de *B. cereus* más altas reportadas en la bibliografía. Sin embargo, se están desarrollando nuevas variantes de arroz que requieren de tiempos de cocción inferiores a 10 minutos. Esta puede ser una alternativa interesante para los pequeños comercios a las variedades convencionales, sin embargo, estos tiempos de cocinado reducidos pueden suponer un riesgo microbiológico adicional. Este tipo de arroz se produce mediante un proceso de cocinado parcial que da lugar fracturas en la superficie del grano facilitando la entrada del agua en posteriores cocciones reduciendo en gran medida el tiempo requerido.

Según lo descrito en la patente correspondiente al inventor Fukumori Takeshi (2016) su proceso de cocinado del arroz consiste en una hidratación del arroz durante 20-30 minutos a 50-80°C. En estos casos el tiempo entre el cocinado parcial y la deshidratación del arroz si es crucial. En la tabla 4 observamos las concentraciones de *B. cereus* tras el cocinado parcial del arroz a 50, 60, 70 y 80°C durante 30 minutos. Estas concentraciones suponen un serio riesgo para la salud no solo, si el almacenamiento hasta etapas posteriores, sino que además algunos tratamientos presentan ya tras este procesado concentraciones inaceptables superiores a las recomendaciones internacionales ($>10^4$ UFC/g). En la tabla 5 se presentan los resultados del módulo de crecimiento durante el almacenamiento a una temperatura adecuada (4°C) y otra de abuso (10°C). En este caso la concentración final es del mismo orden que la inicial en todas las condiciones analizadas.

Tanto en el cocinado tradicional como en el cocinado parcial de la preparación de arroz de rápida cocción nuestro modelo señala la

TABLA 4. Inactivación térmica de *B. cereus* en la etapa de cocinado parcial.

Temperatura (°C)	N ₀ (UFC/g)	N ₁ (UFC/g)
50	10 ²	1,00·10 ²
	10 ⁴	1,00·10 ⁴
	10 ⁶	1,00·10 ⁶
60	10 ²	9,96·10 ¹
	10 ⁴	9,96·10 ³
	10 ⁶	9,96·10 ⁵
70	10 ²	9,42·10 ¹
	10 ⁴	9,41·10 ³
	10 ⁶	9,41·10 ⁵
80	10 ²	3,56·10 ¹
	10 ⁴	3,55·10 ³
	10 ⁶	3,55·10 ⁵

Valores de la concentración de *B. cereus* (N₁) tras el cocinado parcial durante 30 minutos y diferentes temperaturas y concentraciones iniciales N₀.

temperatura y el tiempo del cocinado como los parámetros más correlacionados con la concentración final de *B. cereus* puesto que en ningún escenario incluyendo el tratamiento tradicional se alcanzan concentraciones cercanas a las 10⁴ UFC/g y en los supuestos del arroz de rápida cocción pese al crecimiento de *B. cereus* durante el almacenamiento la concentración del microorganismo se mantiene en el mismo orden de magnitud, por lo que, como se ha indicado, dependerá especialmente del paso previo la concentración final de *B. cereus*.

TABLA 5. Crecimiento de *B. cereus* durante el almacenamiento

Temperatura (°C)	Tiempo (h)	N ₁ (UFC/g)	N ₂ (UFC/g)
4	1	10 ²	1,18·10 ²
		10 ⁴	1,18·10 ⁴
		10 ⁶	1,18·10 ⁶
	5	10 ²	1,20·10 ²
		10 ⁴	1,19·10 ⁴
		10 ⁶	1,19·10 ⁶
	24	10 ²	1,26·10 ²
		10 ⁴	1,26·10 ⁴
		10 ⁶	1,26·10 ⁶
10	1	10 ²	1,24·10 ²
		10 ⁴	1,24·10 ⁴
		10 ⁶	1,24·10 ⁶
	5	10 ²	1,28·10 ²
		10 ⁴	1,28·10 ⁴
		10 ⁶	1,28·10 ⁶
	24	10 ²	1,49·10 ²
		10 ⁴	1,49·10 ⁴
		10 ⁶	1,49·10 ⁶

Valores de la concentración de *B. cereus* (N₂) tras el almacenamiento durante tiempos y a temperaturas y concentraciones iniciales (N₁)

Una de las principales utilidades de los modelos de microbiología es determinar el coeficiente de correlación entre los diferentes parámetros del proceso y la concentración final de microorganismos. Este coeficiente permite dirigir los esfuerzos a los parámetros que mayor influencia van a tener sobre la carga microbiológica final. En las figuras 5 y 6 se aprecian los coeficientes de correlación entre la temperatura, el tiempo y la concentración inicial para la etapa de cocinado y de almacenamiento respectivamente. Según los resultados de nuestro modelo todos los parámetros tienen un efecto importante sobre la concentración final, siendo menor el de la temperatura durante el almacenamiento. El tiempo y la temperatura tienen correlaciones negativas, mientras que el número inicial presenta correlaciones positivas. Esto quiere decir que al aumentar el tiempo o la temperatura disminuiría el número final de microorganismos, mientras que al aumentar el número inicial aumentaría el número final de microorganismos. En el almacenamiento las correlaciones son todas positivas, pues al ser un modelo de crecimiento al aumentar sus valores aumenta el valor final de microorganismos esperados.

Correlación cocinado

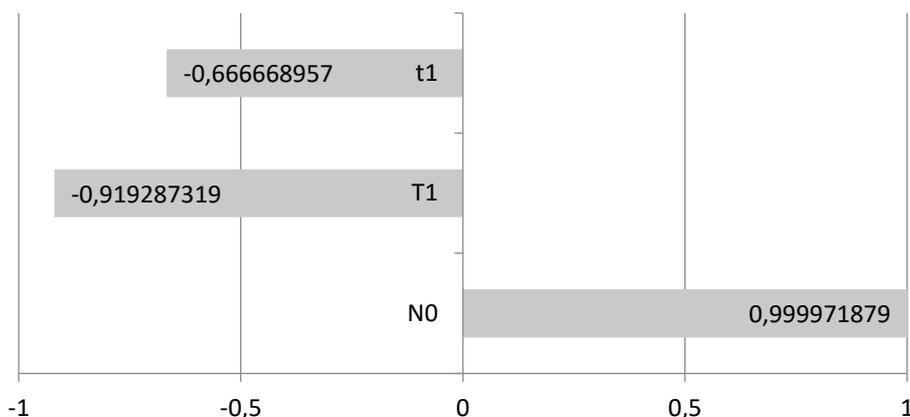


FIGURA 5. Coeficientes de correlación en el cocinado.

Coeficientes de correlación entre los parámetros: concentración inicial de *B. cereus* (N_0), temperatura de cocinado ($T1$) y tiempo de cocinado ($t1$) con la concentración tras el cocinado.

Correlación almacenamiento

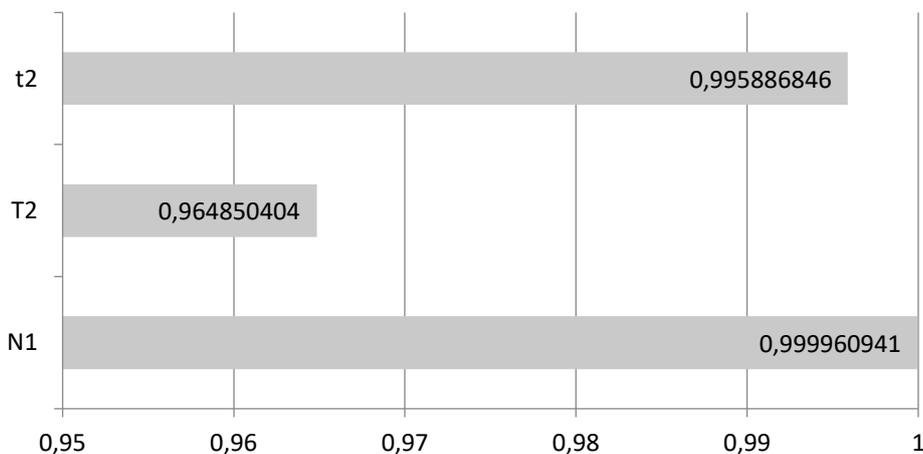


FIGURA 6. Coeficientes de correlación en el almacenamiento.

Coeficientes de correlación entre los parámetros: concentración de *B. cereus* tras el cocinado (N_1), temperatura de almacenamiento ($T2$) y tiempo de almacenamiento ($t2$) con la concentración en el momento del consumo.

Limitaciones del modelo

Las predicciones obtenidas mediante el uso del modelo realizado han de considerarse como orientativas ya que pueden estar sujetas a un gran error respecto a los valores observables y con una gran incertidumbre debido a la calidad de la información que se dispone para los distintos escenarios. La principal limitación de este modelo y a la que probablemente se deba gran parte del error en sus predicciones es que los valores de los parámetros D y z del modelo de inactivación se obtienen sobre un cultivo de células vegetativas sin tener en cuenta la concentración de esporas de *B. cereus* presentes en el alimento que no se inactivarán y que al germinar darán valores de concentración superiores a los calculados por el modelo. Sin embargo, si se sustituye el valor D y z de las células vegetativas con las correspondientes para las esporas, el modelo debe predecir correctamente, tal como se ve en las tablas de validación. De forma similar, los datos usados para el cálculo del modelo de crecimiento provienen del crecimiento de *B. cereus* en medio de cultivo y no sobre la matriz alimentaria, por lo que sería necesario comprobar como difiere el crecimiento sobre arroz frente al crecimiento en el medio e introducir los valores correctos de velocidad específica de crecimiento y de la fase de latencia. Otra gran limitación que presenta este modelo es que por la preparación que sufre el arroz es muy probable que previo a su consumo sea cocinado de nuevo con la inactivación de células vegetativas que eso conlleva por lo que la enfermedad que verdaderamente preocuparía en arroz es el síndrome emético, y conocer la concentración de microorganismos en un momento dado no nos indica la concentración de toxina emética en el alimento, pues la relación entre células vegetativas y producción de toxina emética no es lineal. Otra simplificación del modelo que también supone una fuente de incertidumbre es la heterogeneidad del grupo *Bacillus cereus* “*sensu lato*” y las diferencias entre las propias cepas de *Bacillus cereus sensu stricto* que pueden generar variaciones en las constantes de inactivación y crecimiento muy importantes según sean cepas mesófilas o psicrotófas. No obstante, con los valores adecuados para los parámetros de inactivación y crecimiento, el modelo puede ser de gran utilidad industrial para tener un dato objetivo sobre el número más probable de microorganismos que se puede esperar en las distintas etapas del proceso o antes del consumo. Esto ayuda a especificar los puntos de control críticos dentro de un sistema de APPC de forma más objetivo.

CONCLUSIONES

B. cereus se encuentra en la mayoría de los medios terrestres y sus esporas no son eliminadas por los tratamientos térmicos tradicionales. Estas esporas se encuentran en casi todo tipo de alimentos, carnes, verduras, lácteos y especialmente cereales como el arroz y sus derivados los cuales son los principales alimentos relacionados con el síndrome emético producido por *Bacillus cereus*. El riesgo de enfermar aumenta con la concentración inicial de *B. cereus* en los alimentos, pero por lo general la causa suele ser el crecimiento en alimentos almacenados bajo temperaturas de abuso.

B. cereus crece en la mayoría de los alimentos con un pH y actividad de agua favorables en un gran rango de temperaturas que va desde 4 hasta 48°C según la cepa presente. Pese a los datos predichos por el modelo hay evidencias suficientes para afirmar que la concentración de *B. cereus* al que se exponen los consumidores depende fundamentalmente de la duración y la temperatura del almacenamiento. La etapa de enfriado de alimentos que han recibido un tratamiento térmico es crítica por lo que es recomendable que se aplique un buen sistema de control sobre ella.

En procesos industriales la esterilización es la técnica más adecuada para eliminar las esporas de *B. cereus*. Sin embargo, esto no es posible para comercios de restauración colectiva donde además se suma el deterioro organoléptico que suponen estos tratamientos sobre el plato preparado. Otros tratamientos térmicos menos agresivos como el cocinado tradicional o la pasteurización, así como tratamientos no térmicos como altas presiones hidrostáticas o campos pulsados no son suficientes para eliminar las esporas por lo que deberían añadirse otras barreras adicionales para evitar la germinación y crecimiento de dichas esporas, tales como la refrigeración por debajo de 4°C, una ligera reducción en el pH, o a_w , o aditivos como la nisina.

Las tecnologías actuales con mejores resultados para la reducción del número de esporas de *B. cereus* son la irradiación, la cual no cuenta con una buena acogida por los consumidores y el tratamiento con plasma, la cual sigue en proceso de investigación y desarrollo para que sea más práctica y funcional.

Por lo que respecta al modelo predictivo como se ha dicho en el apartado limitaciones del modelo su aplicación se ve reducida por los aspectos allí mencionados, sin embargo, el modelo ha demostrado comportarse bien cuando las condiciones del cocinado se asemejan a las condiciones de las pruebas experimentales de las que se han obtenido los parámetros de inactivación térmica y crecimiento por tanto sería adecuado para los gestores del riesgo de las empresas de arroz rápido o instantáneo. Esto

puede comprobarse con los valores de BIAS y el factor de exactitud, que si bien no son 1 son bastante cercanos y como dijo el estadístico George Edward Pelham Box “Todos los modelos son incorrectos, pero algunos son útiles”.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar a mi tutor Antonio por su incommensurable ayuda y comprensión que durante estos tiempos extraños y complejos me ha ayudado a terminar este trabajo dentro de los plazos previstos.

También quiero agradecerle a mi pareja todo el apoyo que me ha brindado en nuestro encierro involuntario y a mi madre y yaya, por aguantarme, no solo a mí, si no a ella también.

REFERENCIAS

- Ahmed Ibrahim Jessim, Saad Sabah Fakhry and Samarah Jafar Alwas (2017). Detection and Determination of *Bacillus cereus* in Cooked Rice and Some Types of Spices with Ribosomal 16SrRNA gene Selected from Iraqi Public Restaurants. *Int J Bio-resource Stress Manag.* 2017:382-387. Doi: 10.23910/IJBSM/2017.8.3.1814a
- Alonzo, D. A., Magarvey, N. A., & Schmeing, T. M. (2015). Characterization of cereulide synthetase, a toxin-producing macromolecular machine. *PloS one*, 10(6), e0128569. doi.org/10.1371/journal.pone.0128569
- Anna Berthold-Pluta, Antoni Pluta, Monika Garbowska and Ilona Stefanska (2019) Prevalence and Toxicity Characterization of *Bacillus cereus* in Food Products from Poland. *Foods* 8, 269-281; doi:10.3390/foods8070269
- Agata N, Ohta M, Mori M, Isobe M. (1995) A novel dodecadepsipeptide, cerulide, is an emetic toxin of *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiology Letters*; 129: 17-20. doi.org/10.1111/j.1574-6968.1995.tb07550.x
- Agata N., Ohta M., Yokoyama K. (2002) Production of *Bacillus cereus* emetic toxin (cereulide) in various foods. *International Journal of Food Microbiology* 73, 23 – 27 doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00692-4
- Ankolekar C, Rahmati T, Labbé RG (2009). Detection of toxigenic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* spores in U.S. rice. *Int J Food Microbiol.* 128(3),460-466. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.10.006
- Bennik M.H.J., Smid E.J., Rombouts F.M., Gorris L.G.M. (1995) Growth of psychrotrophic foodborne pathogens in a solid surface model system under the influence of carbon dioxide and oxygen. *Food Microbiology*.;12, 509–519. doi: 10.1016/S0740-0020(95)80135-9.
- Berthold-Pluta, A.; Pluta, A.; Garbowska, M. (2015) The effect of selected factors on the survival of *Bacillus cereus* in the human gastrointestinal tract. *Microb. Pathogenesis*, 82, 7–14. 10.1016/j.micpath.2015.03.015
- Bottone E. (2010) *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. *Clinical microbiology reviews.* 23:382-398. 10.1128/CMR.00073-09
- Bilung Lesley Maurice, Ahmad Syatir Tahar, Tan Pei Shze, Samantha Valarie Furzanne Anak Jamie, Hashimatul Fatma Hashim, Kasing Apun and Son Radu (2016) Enumeration and molecular detection of *Bacillus cereus* in local indigenous and imported rice grains. *Agriculture & Food Security.* 5(1),1-5. doi:10.1186/s40066-016-0074-4
- Bryan F.L., Bartleson C,A, and Cristopherson N. (1981) Hazrd analysis in reference to *Bacillus cereus* of boiled and fried rice in Cantonese style restaurants. *Journal of Food Protection.* 44, 500-512. 10.4315/0362-028X-44.7.500

- Chen D, Li Y, Lv J, et al (2019). A foodborne outbreak of gastroenteritis caused by Norovirus and *Bacillus cereus* at a university in the Shunyi District of Beijing, China 2018: A retrospective cohort study. *BMC Infect Dis.*, 19(1). doi:10.1186/s12879-019-4570-6
- Choma, C., Guinebretiere, M. H., Carlin, F., Schmitt, P., Velge, P., Granum, P. E. and Nguyen-The, C. (2000). Prevalence, characterization and growth of *Bacillus cereus* in commercial cooked chilled foods containing vegetables. *Journal of Applied Microbiology* 88, 617-25. 10.1046/j.1365-2672.2000.00998.x.
- Christina T, Penna V, Moraes DA. (2002) The Influence of Nisin on the Thermal Resistance of *Bacillus cereus*. *J Food Prot.* 65(2), 415-418. doi:10.4315/0362-028X-65.2.415
- Claus, D. and Berkeley, R. C. W. (1986). Genus *Bacillus* Cohn 1872, 174AL in Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E. and Holt, J. G. (Eds), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Williams & Wilkins, pp. 1105-1139. 10.1046/j.1365-2672.2000.00998.x
- Clavel T, Carlin F, Lairon D, Nguyen-The C, Schmitt P. (2004) Survival of *Bacillus cereus* spores and vegetative cells in acid media simulating human stomach. *J Appl Microbiol.*;97(1):214-219. doi:10.1111/j.1365-2672.2004.02292.x
- Collado J., Fernandez A., Rodrigo M. and Martinez A. (2006) Modelling the effect of a heat shock and germinant concentration on spore germination of a wild strain of *Bacillus cereus*. *International Journal of Food Microbiology* 106 (2006) 85 – 89. 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.06.009
- Dack, G.M., Sugiyama, H., Owens, O.J. and Kirsner, J.B. (1954) Failure to produce illness in human volunteers fed *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*. *Journal Infectious Disease* 94, 34–41. 10.1093/infdis/94.1.34
- European Food Safety Authority (EFSA) (2005) Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp in foodstuffs. *The EFSA Journal* 175, 1-48, doi: org/10.2903/j.efsa.2005.175
- European Food Safety Authority (EFSA) (2016) Risks for public health related to the presence of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. including *Bacillus thuringiensis* in foodstuffs. *The EFSA Journal* 14(7):4524, doi: 10.2903/j.efsa.2016.4524
- European Food Safety Authority (EFSA) and European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) (2019) The European Union One Health 2018 Zoonoses Report. *EFSA Journal* 17(12):5926, doi: 10.2903/j.efsa.2019.5926
- Ehling-Schulz, M., Frenzel, E.; Gohar, M. (2015) Food-bacteria interplay: Pathometabolism of emetic *Bacillus cereus*. *Front. Microbiol.*, 6, 704 doi: 10.3389/fmicb.2015.00704
- Fangio M, Roura S, Fritz R. (2010) Isolation and Identification of *Bacillus* spp. and Related Genera from different Starchy Foods. *Journal of Food Science.*;75, M218-M221. 10.1111/j.1750-3841.2010.01566.x

Fernandez A., Ocio M.J., Fernandez P.S., Rodrigo M. and Martinez A. (1999) Application of non linear regression analysis to the estimation of kinetic parameters for two enterotoxigenic strains of *Bacillus cereus* spores. *Food Microbiology*, 16, 607-613. 10.1006/fmic.1999.0282

Fernández, A., Collado, J., Cunha, L.M. , Ocio, M.J. and Martínez A. (2002) Empirical model building based on Weibull distribution to describe the joint effect of pH and temperature on the thermal resistance of *Bacillus cereus* in vegetable substrate. *International Journal of Food Microbiology* 77 :147- 153. 10.1016/s0168-1605(02)00046-6

Finlay WJ, Logan NA, Sutherland AD.(2002) *Bacillus cereus* emetic toxin production in cooked rice. *Food Microbiol.*19(5), 431-439. doi:10.1006/fmic.2002.0505

Food safety Authority of Ireland (FSAI) (2016) *Bacillus cereus*. Microbial Factsheet series. Issue 2 September 2016. www.fsai.ie/WorkArea/DownloadAsset.aspx?id=10919

Fukumori Takeshi, Matsushima Hideaki, Wakabayashi Keishi (2016) Manufacturing Method of Instant Rice. United States Patent Application 20160007638 Chiyoda-ku, Tokyo, JP.

Galvez (2006) Inhibition of toxicogenic *Bacillus cereus* in rice-based foods by enterocin AS-48. *International Journal of Food Microbiology* 106, 185 – 194. 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.08.003

Gil-Turnes C, Freitas dos Santos A, Weykamp da Cruz F, A VM. (1999) Properties of the *Bacillus cereus* strain used in probiotic CenBiot. *Revista de Microbiología*.30,11-4. 10.1590/S0001-37141999000100002

Gilbert RJ, Stringer MF, Peace TC. (1974) The survival and growth of *Bacillus cereus* in boiled and fried rice in relation to outbreaks of food poisoning. *Journal of Hygiene Camb.* 73(3),433-444. doi:10.1017/S0022172400042790

Guinebretiere M, Girardin H, Dargaingnarat C, Carlin F, C N. (2003) Contamination flows for *Bacillus cereus* and spore-forming aerobic bacteria in a cooked, pasteurized and chilled zucchini purée processing line. *International Journal of Food Protection.*;82:223-232. 10.1016/s0168-1605(02)00307-0

Granum P.E., Lund T. (1997) *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiology Letters*, 157(2), 223–228, doi:org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb12776.x

Granum, P.E. and Baird-Parker, T.C. (2001). *Bacillus* species. In Lund, B.M, Baird-Parker, T.C. and Gould, G.W. (eds.), *The microbiological safety and quality of food*, vol. 2, 1029-1039.

Halverson L, Handelsman J. (1991) Enhancement of Soybean Nodulation by *Bacillus cereus* UW85 in the field and in growth chamber. *Applied and Environmental Microbiology.* 57, 2767-2770. 10.1128/AEM.57.9.2767-2770.1991

Harmon SM and Kautter DA. (1991). Incidence and Growth Potential of *Bacillus cereus* in Ready-to-Serve Foods. *J Food Prot.*;54(5), 372-374. doi:10.4315/0362-028X-54.5.372

Hauge, S. (1955) Food poisoning caused by aerobic spore forming bacilli. *Journal of Applied Bacteriology* 18, 591–595. 10.1111/j.1365-2672.1955.tb02116.x

Hocking, Ailsa D (2003) *Bacillus Cereus* and Other *Bacillus* Species. In: Hocking AD (Ed) *Foodborne Microorganisms of Public Health Significance*. 6th Edition. Australian Institute of Food Science and Technology Inc., NSW Branch.

Jaquette CB, Beuchat LR. (1998) Survival and growth of psychrotrophic *Bacillus cereus* in dry and reconstituted infant rice cereal. *J Food Prot.*;61(12):1629-1635. doi:10.4315/0362-028X-61.12.1629

Jullien C, Benezech T, Carpertier B, Lebret V, Faille C. Identification of surface characteristics relevant to the hygienic status of stainless steel for the food industry. *Journal of Food Engineering*. 56, 77-87. 10.1016/S0260-8774(02)00150-4

Jung-Beong Kim, Jeong, H. R., Park, Y. B., Kim, J. M., & Oh, D. H. (2010). Food poisoning associated with emetic-type of *Bacillus cereus* in Korea. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7(5), 555–563, doi: org/10.1089/fpd.2009.0443

Kotiranta A, Lounatmaa K, M H. (2000) Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. *Microbes and Infection*. 2,189-198. 10.1016/s1286-4579(00)00269-0.

Kramer, J. M. and Gilbert, R. J. (1989). *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. *Foodborne bacterial pathogens*. Marcel Dekker Inc, New York, USA.

Lake Rob, Andrew Hudson and Peter Cressey (2004) Risk profile of *Bacillus spp.* in rice. New Zealand Food Safety Authority.

Langeveld, L.P.M., van Sponen, W.A., van Beresteijn, E.C.H. and Notermans, S. (1996) Consumption by healthy adults of pasteurised milk with a high concentration of *Bacillus cereus*: a double-blind study. *Journal of Food Protection* 59, 723–726. 10.4315/0362-028X-59.7.723

Liao, X. Y., Muhammad, A. I., Chen, S. G., Hu, Y. Q., Ye, X. Q., Liu, D. H., & Ding, T. (2019). Bacterial spore inactivation induced by cold plasma. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(16), 2562–2572.

Liao, X. Y., Bai, Y., Muhammad, A. I., Liu, D. H., Hu, Y. Q., & Ding, T. (2020). The application of plasma-activated water combined with mild heat for the decontamination of *Bacillus cereus* spores in rice (*Oryza sativa* L. ssp. japonica). *Journal of Physics D: Applied Physics*, 53, Number 6 064003. <https://doi.org/10.1088/1361-6463/ab573a>.

Little CL, Barnes J, Mitchell RT (2002). Microbiological quality of take-away cooked rice and chicken sandwiches: effectiveness of food hygiene training of the management. *Commun Disease Public Health*. 5(4):289-298. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12564243>. Accessed May 1, 2020.

Maria J. Grande , Rosario Lucas , Hikmate Abriouel , Eva Valdivia , Nabil Ben Omar, Mercedes Maqueda, Manuel Martinez-Bueno, Magdalena Martinez-Cañamero, Antonio Galvez. (2006) Inhibition of toxicogenic *Bacillus cereus* in rice-based foods by enterocin AS-48. *International Journal of Food Microbiology* 106, 185 – 194. 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.08.003

MPI (2016) *Bacillus cereus* Datasheet. www.mpi.govt.nz/dmsdocument/21545/direct Accessed September 5, 2020

Webb, Gary C. Barker, Kaarin E. Goodburn, Michael W. Peck (2019) Risk presented to minimally processed chilled foods by psychrotrophic *Bacillus cereus*. *Trends in Food Science and Technology* 93, 94–105. 10.1016/j.tifs.2019.08.024

Margosch, D., Gänzle, M.G., Ehrmann, M.A., Vogel R.F.(2004) Pressure inactivation of *Bacillus* endospores. *Applied Environmental Microbiology*, 70, 7321-7328. 10.1128/AEM.70.12.7321-7328.2004

Martinez J, Sanchez G, Garay E, Aznar R (2011). Evaluation of phenotypic and PCR-based approaches for routine analysis of *Bacillus cereus* group foodborne isolates. *Antonie van Leeuwenhoek*. 99 (697), 697-709. 10.1007/s10482-010-9545-y

Minhui Kim, Shin Young Park, Tae Jung Park and Sang-Do Ha (2017) Effect of sodium chloride on the reduction of *Bacillus cereus* in shrimp jeotgal during refrigerated storage. *Journal of Food Safety* 37, 1-8 doi: 10.1111/jfs.12281

Mols M, Pier I, Zwietering MH, Abee T. (2009) The impact of oxygen availability on stress survival and radical formation of *Bacillus cereus*. *Int J Food Microbiol*. 2009;135(3):303-311. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.09.002

Nichols GL, Little CL, Mithani V, de Louvois K. (1999). The microbiological quality of cooked rice from restaurants and take away premises in the United Kingdom. *Journal of Food Protection* 62, 877-882. 10.4315/0362-028x-62.8.877

Notermans, S., Dufrenne, J., Teunis, P., Beumer, R., te Giffel, M., Peeters Weem, P. (1997). A risk assessment study of *Bacillus cereus* present in pasteurized milk. *Food Microbiology*, 14, 143-151. 10.1006/fmic.1996.0076

Penna TCV, Moraes DA. (2002) The influence of nisin on the thermal resistance of *Bacillus cereus*. *Journal of Food Protection*; 65: 415-418. 10.4315/0362-028X-65.2.415

Periago, P.M., Moezelaar, P. (2001) The combined effect of nisin and carvacol at different pH and temperature levels on the viability of different strains of *Bacillus cereus*. *International Journal of Food Microbiology* 68, 141-148. 10.1016/s0168-1605(01)00461-5

Pirhonen T, Anderson M, Jääskeläinen E, Salkinoja-Salonen M, Honkanen T, Johansson T.M. (2005). Biochemical and toxic diversity of *Bacillus cereus* in a pasta and meat dish associated with a food-poisoning case. *Food Microbiology*. 22:87-91. 10.1016/j.fm.2004.04.002

- Pol, I. and Smid E.J., (1999) Combined action of nisin and carvacrol on *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology* **29**, 166-170. 10.1046/j.1365-2672.1999.00606.x
- Raeuori, M.T. and Genigeorgis, C. (1975) Effect of pH and sodium chloride on growth of *Bacillus cereus* in laboratory media and certain foods. *Applied Microbiology* **29**, 68-73 PMID: PMC186913
- Raso, J., Marcela, M., Barbosa-Canovas, G.V. and Swanson B.G. (1998) Influence of several environmental factors on the initiation of germination and inactivation of *Bacillus cereus* by high hydrostatic pressure. *International Journal of Food Microbiology* **44**, 125-132. 10.1016/s0168-1605(98)00130-5
- Ray, B. (1992) Nisin of *Lactococcus lactis* ssp *lactis* as a food biopreservative. Pp 207-264 in B. Ray and M.A. Daeschel (ed). *Food Biopreservatives of Natural Origin*. CRC Press Boca Raton Fla
- Ruiz, P., Collado J., Rodrigo, D., Rodrigo, M. and Martínez, A. (2003) Efecto de la germinación en la inactivación de esporas de *Bacillus cereus* por Pulsos eléctricos de alta intensidad. II Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Orihuela, España, 3-6 Junio
- Samapundo S., Everaert H., Wandutu J.N., Rajkovic A., Uyttendaele M., Devlieghere F. (2011) The influence of headspace and dissolved oxygen level on growth and haemolytic BL enterotoxin production of a psychrotolerant *Bacillus weihenstephanensis* isolate on potato based ready-to-eat food products. *Food Microbiology* ;28:298–304. doi: 10.1016/j.fm.2010.04.013.
- Sarrías JA, Valero M, Salmerón MC. (2003) Elimination of *Bacillus cereus* contamination in raw rice by electron beam irradiation. *Food Microbiol.* 2003;20(3):327-332. doi:10.1016/S0740-0020(02)00124-7
- Schoeni, J.L., Lee Wong, A.C. (2005) *Bacillus cereus* food poisoning and its toxins. *Journal of Food Protection*, **68**, 636-648. 10.1111/j.1574-6968.1997.tb12776.x
- Shelef LA and Liang P. (1982) Antibacterial Effects of Butylated Hydroxyanisole (BHA) against *Bacillus* species. *J Food Sci.* **47**(3), 796-799. doi:10.1111/j.1365-2621.1982.tb12717.x
- Tajkarimi M. (2007) *Bacillus cereus*. *PHR* **250**. Davies: https://www.cdfa.ca.gov/ahfss/Animal_Health/PHR250/2007/25007BcerMH_2.pdf
- Tessi M.A., Aringoli E.E., Pirovani M.E., Vincenzini A.Z., Sabbag N.G., Costa S.C., Garcia C.C., Zannier M.S., Silva E.R., Moguilevsky M.A. (2002) Microbiological Quality and Safety of Ready-to-Eat Cooked foods from a centralized School Kitchen in Argentina. *Journal of Food Protection* **65**(4) 636-642. 10.4315/0362-028X-65.4.636.
- Thirkell CE, Sloan-Gardner TS, Kaczmarek MC, Polkinghorne BG. (2019) An outbreak of *Bacillus cereus* toxin-mediated emetic and diarrhoeal syndromes at a restaurant in Canberra, Australia 2018. *Communicable Diseases Intelligence* **2018** - Sep 16; **43**, 1-9. doi: 10.33321/cdi.2019.43.40.

UERIA (2011) Perfil de riesgo *Bacillus cereus* en alimentos listos para su consumo no industrializados. Ministerio de la Protección Social Unidad de Evaluación de Riesgos para la Inocuidad de los Alimentos UERIA Instituto Nacional de Salud INS. ISBN: 978-958-13-0149-2

Ultee A, Slump RA, Steging G, Smid EJ. (2000) Antimicrobial activity of cavacrol toward *Bacillus cereus* on rice. *Journal of Food Protection*; 63: 620-624

Valero M., Leontidis S., Fernández P., Martínez A. and Salmerón C. (2000) Growth of *Bacillus cereus* in natural and acidified carrot substrates over the temperature range 5-30 °C. *Food Microbiology* 17, 605-612. 10.1006/fmic.2000.0352

Vilas-Boas G, Peruca A. (2007) Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis* and *Bacillus thuringiensis*. *Canadian Journal of Microbiology* 53, 673-687. 10.1139/W07-029

Webb MD, Barker GC, Goodburn KE and Peck MW (2019) Risk presented to minimally processed chilled foods by psychrotrophic *Bacillus cereus*. *Trends in Food Science & Technology*, 93:94-105. doi.org/10.1016/j.tifs.2019.08.024

WHO (1999) High-dose irradiation: wholesomeness of food irradiated with dose above 10 kGy. WHO Technical Report Series 890. ISBN 9241208902

Yu S, Yu P, Wang J, et al (2020). A Study on Prevalence and Characterization of *Bacillus cereus* in Ready-to-Eat Foods in China. *Front Microbiol.* 2020;10:3043. doi:10.3389/fmicb.2019.03043