



v.1, n.3, 2024 - JULHO

Revista Multidisciplinar

PESQUISA DE BACTÉRIAS VEGETATIVAS E
ESPOROGÊNICAS EM MEL

MARLI DA SILVA MENDES



Fontes: <https://super.abril.com.br/coluna/bzzzzzz/nao-o-mel-nao-e-feito-do-vomito-das-abelhas>

PERIÓDICO CIENTÍFICO INDEXADO INTERNACIONALMENTE

DOI: 10.5281/zenodo

DOI: 10.69720/Crossref

ISSN

International Standard Serial Number

2966-0599

www.ouniversoobservavel.com.br

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MATO GROSSO DO SUL
CIDADE UNIVERSITÁRIA DE DOURADOS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

MARLI DA SILVA MENDES

PESQUISA DE BACTÉRIAS VEGETATIVAS E ESPOROGÊNICAS EM MEL

DOURADOS-MS

2014

PESQUISA DE BACTÉRIAS VEGETATIVAS E ESPOROGÊNICAS EM MEL

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado como parte dos requisitos para obtenção do título de Licenciado em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul.

Discente: **Marli da Silva Mendes**

Orientadora: **Prof^a. Dr^a. Emília Maria Silva**

Revista o Universo Observável

DOI: 10.5281/zenodo.12637463

[ISSN: 2966-0599](https://doi.org/10.5281/zenodo.12637463)

REFERÊNCIA

MENDES, M. S.; SILVA, E. M. **PESQUISA DE BACTÉRIAS VEGETATIVAS E ESPOROGÊNICAS EM MEL. O Universo Observável**, v. 1, n. 3, p. 2-20, 03 jul., 2024. ISSN: 2966-0599. DOI: **10.5281/zenodo.12637463**. Disponível em: <https://ouniversoobservavel.com.br/>. Acesso em: 03 jul. 2024.

DOURADOS-MS

2014

Revista O Universo Observável - v.1, n.3, jul., 2024 **3**

MARLI DA SILVA MENDES

PESQUISA DE BACTÉRIAS VEGETATIVAS E ESPOROGÊNICAS EM MEL

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como parte dos requisitos para obtenção do título de Licenciado em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul.

Aprovado em 27 de novembro de 2014

Prof^a. Dr^a. Emília Maria Silva - Orientadora – UEMS _____

Prof. Esp. Luciana Gonçalves de Azevedo – UEMS _____

Prof. Me. Pérciles David dos Santos Julio – UEMS _____

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes da minha vida,

A minha mãe e meu filho;

Pela ajuda e a paciência que tiveram comigo;

Pelo amor e carinho;

Pelo apoio incondicional, enfim,

Pelo que sou.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof^ª. Dr^ª. Emília Maria Silva, pela disponibilidade, dedicação, incentivo, apoio e ajuda na orientação deste trabalho que me ajudou a cumprir meus objetivos e a concretizar esta etapa da minha formação acadêmica.

À Prof^ª. Luciana Gonçalves de Azevedo, técnica de laboratório, pelo apoio na realização das pesquisas e da disponibilidade do laboratório para a realização das análises, muito obrigado e com certeza todo esse aprendizado vou levar para o resto da minha vida.

RESUMO

O mel contém elevada concentração em açúcares, e outros fatores, que desfavorecem o crescimento de microrganismos, sendo encontrados sobretudo os esporulados. A contaminação primária, devida às próprias abelhas, vem do néctar, parte de plantas, das próprias abelhas, suas larvas e do ambiente da colméia. A contaminação secundária, seja por microrganismos esporulados ou não, ocorrerá por influência ambiental e humana durante a coleta e envase, dependendo da higiene. Foram pesquisados representantes das fases primária e secundária de contaminação em nove méis de *Apis mellifera* comercializados em Dourados, MS. Para pesquisa das bactérias esporogênicas aeróbias mesófilas, o mel suspenso em salina peptonada a 0,1% foi inoculado em porções de 10 ml, 1 ml e 0,1 ml em frascos contendo 100 ml de TGE, pH 7,0 a 50-55°C. Homogeneizou-se, submeteu-se a choque térmico de 10min/80°C, distribuiu-se o volume de cada frasco em placas estéreis e incubou-se a 30°C/48h. Para pesquisa de estafilococo coagulase positiva o mel foi suspenso em salina peptonada a 0,1% seguindo-se diluição seriada até 10^{-4} . De cada diluição foi inoculado por incorporação 0,1 ml em placas com AMS, pH 7,4. Incubou-se a 28-32 °C/48h. Não se obteve cultura típica desenvolvida em AMS e de todos os méis se obteve bactérias esporogênicas aeróbias mesófilas em TGE, respectivamente, as maiores contagens, 121 e 87 esporos/g para os méis (florada/localidade) V (silvestre/Fátima do Sul) e VI (silvestre/Dourados), e contagens menores, 3,5 e 7,0 esporos/g para os méis VIII (eucalipto/São Paulo) e III (silvestre/Ponta Porã). Inferiu-se que duas amostras tiveram contaminação de fonte secundária.

Palavras-chaves: mel, estafilococo coagulase positiva, bactéria esporogênica aeróbia mesófila.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Tipos de mel, procedência e data da coleta	15
Tabela 2 Densidade de estafilococos coagulase positiva e de esporos de bactérias mesófilas aeróbias em mel	16

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 REFERENCIAL TEÓRICO	9
2.1 Bactérias esporogênicas mesófilas aeróbias	9
2.2 Estafilococos coagulase positiva	9
3 OBJETIVOS	11
3.1 Objetivo geral	11
3.2 Objetivos específicos	11
4 MATERIAL E MÉTODOS	12
4.1 Material	12
4.1.1 Vidraria, aparelhos e outros materiais	12
4.1.2 Amostras de mel	12
4.1.3 Meios de cultura e soluções (SILVA et al., 2007)	12
4.2 Métodos	12
4.2.1 Determinação de estafilococos coagulase-positivos (SILVA et al., 2007)	13
4.2.1.1 Método de Gram (NEDER, 1992)	13
4.2.1.2 Teste da catalase (LARPENT; LARPENT-GOURGAUD, 1975)	13
4.2.1.3 Evidenciação da coagulase (BRASIL, 1981)	14
4.2.2 Contagem de esporos de mesófilos aeróbios (SILVA et al., 2007)	14
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
6 CONCLUSÃO	17
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18

1 INTRODUÇÃO

O mel é substrato que não favorece o desenvolvimento de microrganismos devido ter elevado conteúdo em açúcares, principalmente frutose e glicose (CAMPOS *et al.*, 2003) que lhe proporcionam alta força osmótica e a outras propriedades como a formação de peróxido de hidrogênio, a baixa atividade de água, presença de compostos fenólicos e a outros fatores desconhecidos. (TAORMINA *et al.*, 2001).

Contudo, o mel não é estéril; pode abrigar microrganismos que podem se manter viáveis por longos períodos como, por exemplo, os formadores de esporos.

As bactérias esporogênicas podem ser de fonte primária, ou seja, como se fossem próprias do mel, se estiveram antes presentes na fonte de néctar, na colméia, na superfície externa das abelhas ou no seu aparelho digestório. E também podem ser de fonte externa, secundária, sendo incorporadas ao produto por ocasião da colheita e envase, como exemplos, pelo ar ambiente, poeira, pelos manipuladores e pelo equipamento e utensílios contaminados. (SNOWDON; CLIVER, 1996; OLAITAN *et al.*, 2007).

Os estafilococos coagulase positiva, se presentes em mel, provavelmente sejam de fonte externa visto serem encontrados em humanos, em ambientes por eles frequentados e em objetos de uso pessoal. Havendo condição favorável, como o aumento no teor de umidade, as bactérias do mel podem se desenvolver e com isso alterar o produto, diminuindo o tempo de viabilidade de consumo.

Esta pesquisa visou trazer informações sobre os conteúdos de bactérias esporogênicas e estafilococos coagulase positiva em amostras de mel comercializadas em Dourados, MS.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Bactérias esporogênicas mesófilas aeróbias

De acordo com Silva et al. (2007), endósporos, ou esporos internos, são estruturas que resistem a condições ambientais que seriam letais para células vegetativas de bactérias. Após serem formados, os esporos permanecem em estado de dormência, não tem atividade metabólica, não se multiplicam, suportam o congelamento, a desidratação, a irradiação, a presença de conservantes, tratamento com desinfetante e a exposição a altas temperaturas. Entretanto, em condições favoráveis, podem germinar e dar origem a novas células vegetativas.

Entre as bactérias aeróbias mesófilas formadoras de esporos e associadas com alimento estão os bastonetes do gênero *Bacillus* (SILVA et al, 2007). Embora haja muitas espécies no gênero *Bacillus*, as espécies *B. anthracis* e *B. cereus* se destacam por causarem, respectivamente, infecção natural ou experimental como arma biológica, e intoxicação alimentar por colonização do intestino delgado. O *B. cereus* produz enterotoxina e cresce causando no ser humano a síndrome diarreica e emética. (GOMES, 2013).

Os esporos do *Bacillus cereus* são hidrófobos, ou seja, aderem fortemente às superfícies de aço inoxidável e de diversos materiais, resistindo aos procedimentos de limpeza e podendo provocar problemas nas indústrias de alimentos (GOMES, 2013).

As bactérias esporuladas mais pesquisadas em mel são do gênero *Clostridium*, que é anaeróbio estrito. Há bem menos informações sobre bactérias esporuladas aeróbias, como o gênero *Bacillus*.

Contudo, Kokubo et al. (1984) *apud* Snowdon; Cliver (1996) investigaram 74 amostras de mel e encontraram esporos bacterianos em 67 amostras. Dessas, a maioria era de *Bacillus*, sendo predominante o *B. cereus* seguido por *B. coagulans*, *B. megaterium* e *B. alvei*.

2.2 Estafilococos coagulase positiva

A pesquisa de estafilococos produtores de coagulase se faz porquê muitas vezes está associada à capacidade da produção de enterotoxinas, sendo um indicador indireto do potencial patogênico do microrganismo (FDA, 2001).

Essas enterotoxinas são termoestáveis e resistem à cocção e a enzimas proteolíticas, e basta uma dose de toxina menor que 1,0 µg/Kg (300 a 500ng) em alimentos contaminados

para produzir sintomas de toxinose por estafilococos (BALABAN, N.; RASOOLY, A., 2000 *apud* SANT´ANA; AZEREDO, 2005). A toxina é produzida quando a quantidade das bactérias está entre 10^5 e 10^6 UFC/g ou ml do alimento.

Os sintomas da toxinose, que aparecem dentro de 1-6 horas após a ingestão de um alimento contaminado, são caracterizados por náusea, vômito, espasmo abdominal e diarreia. Em casos severos, muco e sangue são observados no vômito e nas fezes, como citam Raddi et al. (1988).

Entre as espécies coagulase positivas, que são *Staphylococcus aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus* (Doyle, 1989 *apud* Sant´Ana; Azeredo, 2005), foi enfocada neste trabalho a *S. aureus* devido sua frequência em humanos (TRABULSI; ALTHERTUM, 2008).

De acordo com Trabulsi; Althertum (2008) e Franco (2005), os *Staphylococcus aureus* medem aproximadamente 0,5 a 1 μm de diâmetro, ocorrem isolados, aos pares e em agrupamentos semelhantes a cachos de uvas. São imóveis e não formam esporos. São Gram-positivos, anaeróbios facultativos, a maioria pode multiplicar-se em 7,5% a 15% de NaCl. Fermentam carboidratos e produzem pigmentos amarelo-ouro.

Os *S. aureus*, embora patogênicos, são comumente encontrados na pele e mucosas de humanos e animais saudáveis, nas vias aéreas superiores do homem, sendo facilmente transferidos para os alimentos por meio do contato direto com as mãos ou por perdigoto. (TRABULSI; ALTHERTUM, 2008; FRANCO, 2005; RADDI et al., 1988).

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Avaliar amostras de mel quanto ao conteúdo de bactérias de fontes primária e secundária visando o consumo humano.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar a densidade de bactérias esporogênicas mesófilas aeróbias.

Avaliar a densidade de estafilococos coagulase positivos.

Avaliar as condições higiênico-sanitárias das amostras de mel.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Vidraria, aparelhos e outros materiais.

Vidraria comum de laboratório.

Aparelhos: autoclave, banho-maria, balança analítica, estufa de esterilização e secagem, estufa incubadora, geladeira, microscópio óptico, pHmetro, agitador de tubos, micropipeta com ponteiros para 1000 µl e para 100 µl.

4.1.2 Amostras de mel

Foram adquiridos méis de *Apis mellifera* disponibilizados no comércio, sendo estas amostras inspecionadas por órgãos oficiais. As amostras foram colhidas entre outubro de 2012 a fevereiro de 2014 e analisadas dentro do período de validade que é de dois anos após a colheita. As amostras foram mantidas nas embalagens de origem e em local fresco e seco.

4.1.3 Meios de cultura e soluções (SILVA et al., 2007).

Ágar Manitol Sal (AMS); g/l:

Peptona (10,0), extrato de levedura (1,0), NaCl (75,0), d-manitol (10,0), vermelho de fenol (0,025), ágar (18,0), água destilada (1000,0 ml). pH $7,4 \pm 0,2$. Autoclavar a 121°C , 15 min.

Ágar Triptona Glicose Extrato de Carne (TGE); g/l:

Triptona (5,0), peptona de carne (3,0), glicose (1,0), ágar (18,0), água destilada (1000,0 ml). pH $7,0 \pm 0,2$. Distribuir 100 ml/frasco já contendo a porção de ágar. Autoclavar a 121°C , 15 min.

Solução salina peptonada a 0,1%; g/l:

NaCl (8,6), peptona (1,0), água destilada (1000,0 ml). Distribuir 9ml/tubo para determinação de estafilococos coagulase-positivos e 90ml/frasco para contagem de esporos de bactérias mesófilas aeróbias. Autoclavar 121°C , 15 min.

4.2 Métodos

As análises foram feitas em duplicatas.

4.2.1 Determinação de estafilococos coagulase-positiva (SILVA *et al.*, 2007).

Pesar 10 g de mel e diluir em 10 ml de salina peptonada (1:1, m/v). A partir desta suspensão-mãe proceder à diluição seriada até 10^{-4} em salina peptonada a 0,1%. Homogeneizar as suspensões a cada diluição.

De cada diluição colocar 100 μ l em placa esterilizada. Verter 20 ml do meio de Ágar Manitol Sal, pH 7,4, resfriado a aproximadamente 45 °C (método *pour-plate*). Homogeneizar, aguardar solidificação, selar a placa com filme plástico e incubar a 28-32 °C, por 48h.

Contar o número de colônias características com formato circular, convexas, cremosas e brilhantes, cor amarelo ouro. Obter culturas puras para submeter ao método de Gram e testes catalase e coagulase.

4.2.1.1 Método de Gram (NEDER, 1992)

Preparar um esfregaço espalhando-se uniformemente pequena porção de colônia bacteriana misturada a uma gota de água em uma lâmina de microscopia. Deixar secar ao ar. Fixar o esfregaço passando a lâmina 3 vezes pela chama. Esfriar. Corar pelo Método de Gram.

Técnica de coloração:

Cobrir o esfregaço com solução de cristal violeta ou de violeta de genciana (corante). Deixar 1 minuto. Esgotar a lâmina e cobrir com a solução de lugol (mordente). Deixar 1 minuto. Esgotar a lâmina e, mantendo-a inclinada, gotejar álcool a 95% até não se desprender mais corante da preparação. Lavar em água corrente. Cobrir a lâmina com solução de fucsina durante 30 segundos. Lavar em água corrente. Secar.

Examinar ao microscópio, com objetiva de imersão. Anotar a coloração das bactérias e outras características, como morfologia e modalidade de agrupamento celular.

Estafilococos são cocos Gram-positivos encontrados isolados ou em tétrades ou em “cacho de uva”.

4.2.1.2 Teste da catalase (LARPENT; LARPENT-GOURGAUD, 1975).

Homogeneizar pequena porção da colônia bacteriana em uma lâmina de microscopia contendo 2 gotas de água oxigenada a 3%. Não agitar. O desprendimento de bolhas de gás (O₂) indicará a presença da catalase.

4.2.1.3 Evidenciação da coagulase (BRASIL, 1981).

Inocular pequena porção da colônia de cocos Gram-positivos em tubos contendo 1 ml de Caldo Cérebro-Coração (BHI) e incubar a 37 °C durante 24 h. Após, transferir 0,3 mL desse cultivo para tubo contendo 0,5 ml de plasma oxalatado e incubar a 37 °C por 4 h. Verificar a presença de coágulos. Se a reação for negativa, incubar novamente por até 24 h para a confirmação dos resultados.

4.2.2 Contagem de esporos de mesófilos aeróbios (SILVA et al., 2007).

Pesar 10 g de mel e diluir em 90 ml de água salina peptonada (1:10, m/v).

Inocular porções de 10 ml, 1 ml e 0,1 ml do mel diluído em três frascos diferentes contendo 100 ml de ágar TGE, pH 7,0, previamente fundido e resfriado 50-55 °C. Homogeneizar. Submeter a choque térmico de 10min. a 80 °C, em banho-maria com temperatura controlada a fim de matar as células vegetativas. Iniciar a contagem do tempo quando todos os frascos atingirem temperatura de 80 °C, usando frasco com TGE não inoculado e contendo um termômetro.

Após, distribuir o volume de cada frasco em cinco placas vazias e esterilizadas (20 ml/placa). Aguardar a solidificação e incubar as placas a 30 °C por 48h.

Contar as Unidades Formadoras de Colônias (UFC) desenvolvidas em cada conjunto de cinco placas com diluição apropriada para a contagem (com 25 a 250 colônias).

Cálculo do número de esporos/g, de acordo com o volume do inóculo:

Inóculo de 10 ml: Esporos/g = n° UFC.

Inóculo de 1 ml: Esporos/g = n° UFC x 10;

Inóculo de 0,1 ml: Esporos/g = n° UFC x 100.

O número de esporos que pode ser quantificado por essa técnica varia de 1 a 150.000/g.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram analisadas sete amostras de mel silvestre provenientes da região sul de Mato Grosso do Sul e duas amostras de mel unifloral provenientes de São Paulo-SP, coletadas entre outubro de 2012 a fevereiro de 2014 (Tabela 1) e analisadas dentro do período de validade.

Tabela 1 Tipos de mel, procedência e data da coleta.

Amostra de mel	Florada predominante	Município	Coleta
I	silvestre	Jardim	out/2012
II	silvestre	Dourados	nov/2013
III	silvestre	Ponta Porã	dez/2013
IV	silvestre	Itaporã	fev/2013
V	silvestre	Fátima do Sul	fev/2014
VI	silvestre	Dourados	fev/2014
VII	silvestre	Dourados	jan/2014
VIII	eucalipto	São Paulo	set/2013
IX	laranjeira	São Paulo	mai/2013

As amostras foram investigadas quanto às concentrações de bactérias mesófilas aeróbias formadoras de esporos e de estafilococos coagulase positiva.

Em nenhuma das amostras teve ocorrência de estafilococos coagulase positiva. Como citam Snowdon; Cliver (1996), o “mel natural” contém muito poucos tipos de microrganismos e é desprovido de bactérias não-formadoras de esporos. Olaitan et al. (2007) reforçam sugerindo que bactérias não formadoras de esporos geralmente não são encontradas no mel, não são próprias do mel, devido não ter condição para sobrevivência. Quando introduzidas experimentalmente no mel, sobreviveram apenas poucas horas.

Taormina et al. (2001) compararam a atividade antimicrobiana de méis em relação a várias espécies de bactérias. Encontraram que o *B. cereus* foi pouco afetado. E que houve inibição do crescimento de *S. sonnei*, *L. monocytogenes* e *S. aureus* em soluções de mel a 25%. Os autores inferem que o efeito microbicida seria devido ao peróxido de hidrogênio, que é produzido naturalmente devido à ocorrência da enzima glicose oxidase no mel, e também devido aos compostos fenólicos.

Em todas as amostras haviam bactérias aeróbias esporogênicas em concentrações que variaram entre 3,5 esporos/g no mel de eucalipto oriundo de São Paulo-SP a 121,0 esporos/g no mel silvestre coletado em Fátima do Sul-MS (Tabela 2). As diferenças nas concentrações dessas bactérias, além da presença natural delas, pode também indicar se houve cuidados de higiene durante procedimentos de coleta e envase do mel.

Tabela 2 Densidade de estafilococos coagulase positiva e de esporos de bactérias mesófilas aeróbias em mel.

Amostra de mel	Estafilococos coagulase positiva/g	Esporos de mesófilos aeróbios/g		
		Contagem 1	Contagem 2	Média
I	0	28	15	21,5 (± 9,19)
II	0	30	23	26,5 (± 4,95)
III	0	5	9	7,0 (± 2,83)
IV	0	34	42	38,0 (± 5,66)
V	0	111	131	121,0 (± 14,14)
VI	0	63	111	87,0 (± 33,94)
VII	0	16	13	14,5 (± 2,12)
VIII	0	5	2	3,5 (± 2,12)
IX	0	9	10	9,5 (± 0,71)

Na legislação brasileira para a qualidade do mel não constam parâmetros sobre presença e quantificação de microrganismos em méis (BRASIL, 2000). E na legislação pertinente ao Mercosul constam somente critérios microbiológicos em relação aos coliformes totais/g, *Salmonella* spp - *Shigella* spp/25 g, e fungos e leveduras UFC/g (MERCOSUL, 1994).

De acordo Olaitan et al. (2007), bactérias do gênero *Bacillus*, que é aeróbia e formadora de esporos, tem sido os mais encontrados em superfícies externas e intestinos de abelhas, bem como nas plantas fontes de néctar.

Iurlina; Fritz (2005) encontraram presença de *Bacillus* em todas as 70 amostras de mel polifloral que pesquisaram, na Argentina.

López; Alippi (2010) pesquisaram 132 culturas de *B. cereus* e 52 culturas de *B. megaterium* isoladas de mel, quanto à presença de quatro genes com perfil enterotoxigênico e seu relacionamento com atividades hemolíticas e produção de coagulase, por essas bactérias.

As autoras observaram a correlação entre a atividade coagulase e a presença dos fatores de virulência, sendo este o primeiro trabalho que estabeleceu esta correlação em bactérias do gênero *Bacillus*. Sugerem que o mel, tido como produto saudável (BOGDANOV, 2006) pode também ser veículo de enfermidades.

6 CONCLUSÃO

Não foi encontrado em nenhuma das amostras de mel contaminação por *Staphylococcus* coagulase positiva. Porém, em todas as amostras haviam bactérias aeróbias esporogênicas, sendo que nas duas amostras com contagens mais altas é possível supor que tenham havido falhas quanto à aspectos de higiene na coleta e envase do mel.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOGDANOV S. Contaminants of bee products. **Apidologie**, v.37, p.1–18, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal. I. Métodos Microbiológicos. In: **Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes**. Brasília, 1981.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa 11, de 20 de outubro de 2000. **Regulamento técnico de identidade e qualidade do mel**. Diário Oficial, Brasília, 20 de outubro de 2000, Seção 1, p. 16-17.

CAMPOS, G.; DELLA-MODESTA, R. C.; SILVA, T. J. P.; BAPTISTA, K. E.; GOMIDES, M. F.; GODOY, R. L. Classificação do mel em floral ou mel de melato. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.23, n1, p.1-5, jan.-abr. 2003.

FDA - FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Center for Food Safety and Applied Nutrition. BENNETT, R.W.; LANCETTE, G.A. **Staphylococcus aureus**. In: _____. USA. 2001. Disponível em: <www.fda.gov/food/foodscienceresearch/laboratorymethods/ucm071429.htm>. Acesso em 03 de julho de 2013.

FRANCO, B. D. G. M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2005.

GOMES, M. J. P. **Tópicos em Bacteriologia Veterinária. Gênero *Bacillus* spp.** Apostila. FAVET-UFRGS, 2013. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/labacvet/files/G%C3%AAneros%20Bacillus%204-2013-1%20vers%C3%A3o%202013.pdf>>. Acesso em 13 de outubro de 2014.

IURLINA, M. O.; FRITZ, R. Characterization of microorganisms in Argentinean honeys from different sources. **International Journal of Food Microbiology**, v. 105, p. 297-304. 2005. Disponível em: <http://www.untiredwithloving.org/honey_abacterial_props.pdf>. Acesso em: Acesso em 13 de outubro de 2014.

LARPENT, J.P.; LARPENT-GOURGAUD, M. **Microbiologia prática**. São Paulo: Edgard Blücher, Edusp, 1975. 163 p.

LÓPEZ, A. C.; ALIPPI, A. M. Enterotoxigenic gene profiles of *Bacillus cereus* and *Bacillus megaterium* isolates recovered from honey. **Revista Argentina de Microbiología**, v.42, p. 216-225. 2010.

MERCOSUL GMC Resolução 15/1994. Disponível em
<http://www.inmetro.gov.br/barreirastecnicas/PDF/GMC_RES_1994-015.pdf>. Acesso em 10 de setembro de 2014.

NEDER, R. N. **Microbiologia: Manual de laboratório**. São Paulo: Nobel, 1992. 138p.

OLAITAN, P. B.; ADELEKE, O. E.; OLA, I. O. Honey: a reservoir for microorganisms and an inhibitory agent for microbes. **African Health Sciences**, v.7, n.3, p.159-165. 2007.

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2269714/pdf/AFHS0703-0159.pdf>>. Acesso em 13 de outubro de 2014.

RADDI, M. S. G.; LEITE, C. Q. F.; MENDONÇA, C. P. *Staphylococcus aureus*: portadores entre manipuladores de alimentos. **Revista Saúde Pública**, v.22, n.1, p.36-40. 1988.

Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rsp/v22n1/05.pdf>. Acesso em: 13 de outubro de 2014.

SANT'ANA, A. S.; AZEREDO, D. R. P. Comparação entre o sistema Petrifilm RSA® e a metodologia convencional para a enumeração de estafilococos coagulase positiva em alimentos. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v.25, n.3, p.531-535. 2005.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3 ed. São Paulo: Livraria Varela, 2007. 552 p. ISBN: 978-85-7759-003-2

SNOWDON, J. A.; CLIVER, D. O. Microorganisms in honey. **International Journal of Food Microbiology**. v. 31, p.1-26. 1996.

TAORMINA, P. J.; NIEMIRA, B. A.; BEUCHAT, L. R. Inhibitory activity of honey against foodborne pathogens as influenced by the presence of hydrogen peroxide and level of antioxidant power. **International Journal of Food Microbiology**, v.69, p.217-225. 2001.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5 ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 760p. 2008.