

Charakterystyka toksyny wymiotnej *Bacillus cereus*

ANNA BERTHOLD, BEATA DOROSZKIEWICZ

Zakład Biotechnologii Mleka Katedry Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności Wydziału Nauk o Żywności SGGW,
ul. Nowoursynowska 159c, 02-787 Warszawa

Berthold A., Doroszkiewicz B.

Characteristics of *Bacillus cereus* emetic toxin

Summary

Cereulide, an emetic toxin produced by specific *Bacillus cereus* strains, is neither able to degrade starch, nor can it ferment salicin, and shows weak haemolysis. It is a cyclic low-molecular (1.2 kDa) ring-shaped peptide. Cereulide is resistant to heat (121°C/90 minutes), digestive enzymes, trypsin and pepsin.

Pathological symptoms evoked by cereulide are nausea and vomiting, which may occur 1 to 5 hours after the ingestion of a contaminated food product and continue for about 24 hours. Cereulide causes changes in hepatic cell mitochondria (vacuolation) that consequently lead to liver damage. The toxic dose for an adult is 400-500 µg of cereulide.

Since it is a very widespread species in the environment, there is a high risk of *Bacillus cereus*-mediated food poisoning. The main cause of this type of food poisoning are products containing boiled or fried rice and foods rich in starch, such as pasta. Since the condition has a short duration, cases of emetic type food poisoning provoked by cereulide are frequently not even reported to the health service authorities and are therefore highly underestimated in official statistics. The presence of L-leucine, or L-valine aminoacids in a product markedly intensifies the process of the emetic toxin production by *Bacillus cereus*. Cereulide synthesis is also positively affected by the presence of oxygen. The optimal temperature for cereulide formation ranges from 15 to 20°C, whereas its production at 8-10°C or at a temperature exceeding 35°C is minimal.

Keywords: cereulide, emetic toxin, food products, *Bacillus cereus*

Bacillus cereus jest gatunkiem należącym do rodzaju *Bacillus* powszechnie występującym w przyrodzie – w glebie, powietrzu, skąd bez trudu przenosi się do wszelkich produktów spożywczych. Najczęściej izolowany jest ze zbóż, głównie ryżu, potraw mącznych (makarony), z surowego i pasteryzowanego mleka oraz przetworów mleczarskich, a także przypraw i owoców morza (7-10, 16).

Wiele szczepów *B. cereus* posiada zdolność wytwarzania toksyn. Do tej pory dokładnie poznano kilka enterotoksyn: enterotoksynę hemolityczną HBL i niehemolityczną NHE (trójskładnikowe toksyny wywołujące zatrucia biegunkowe), a także enterotoksynę T, enterotoksynę FM, cytotoksynę K i cereulidynę (toksyny jednoskładnikowe) (16, 26).

W opracowaniu scharakteryzowano toksynę wymiotną (cereulidynę) pod względem budowy chemicznej, optymalnych warunków tworzenia oraz metod wykrywania w produktach żywnościowych. Przedstawiono także przypadki zatruc pokarmowych wywołanych po spożyciu żywności zanieczyszczonej cereulidyną.

Charakterystyka i budowa chemiczna cereulidyny

Cereulidyna to cykliczny, niskocząsteczkowy (1,2 kDa), pierścieniowy związek białkowy. Złożona jest z czterech asymetrycznych centrów z trójczasowo powtarzającym się tetrapeptydem: (D-O-Leu-D-Ala-L-O-Val-L-Val)₃. Głównym łańcuchem tego kompleksu jest heksagonalny „cylinder” z podstawnikami ułożonymi na zewnątrz pierścienia (13).

Cereulidyna jest jedną z najbardziej opornych na różne czynniki stresu enterotoksyn. Przetrzymuje ogrzewanie w temperaturze 121°C przez 90 minut oraz w pH 2-11 przez 2 godziny, nie tracąc swej aktywności. Nie jest rozkładana przez enzymy trawienne, trypsynę i pepsynę (16).

Toh i wsp. (31) wysnuli hipotezę, że cykliczna struktura, obecność form D-aminokwasów i powstawanie w późnej fazie wykładniczej i stacjonarnej wzrostu może wskazywać na nierybosomalny mechanizm biosyntezy cereulidyny. Badacze udowodnili, że toksyna wymiotna tworzona jest przez kompleks nierybosomalnej syntetazy peptydowej (syntetaza cereulidyny).

Objawy chorobowe wywołane przez cereulidynę to nudności i wymioty, które mogą wystąpić w 1-5 godzin od spożycia zanieczyszczonego produktu i utrzymać się przez około 24 godziny. Toksyczność cereulidyny w organizmie objawia się zmianami w mitochondriach (wakuolizacją) komórek wątrobowych, a co za tym idzie – uszkodzeniem wątroby. Dawką toksyczną dla dorosłego człowieka jest 400-500 µg cereulidyny (22).

Czynniki wpływające na wytwarzanie cereulidyny

Ważnym czynnikiem zewnętrznym, mającym wpływ na zdolność drobnoustrojów do wytwarzania toksyn jest temperatura otoczenia. Finlay i wsp. (14) określili zdolność wytwarzania cereulidyny przez 7 szczepów *B. cereus* w temperaturze od 10° do 50°C na pożywce zawierającej odtłuszczone mleko w proszku. Nie zaobserwowali wytwarzania cereulidyny w temperaturze poniżej 12°C. Najwięcej toksyny szczepy wytwarzały w zakresie temperatury 12°-15°C. Tymczasem standardowa temperatura, stosowana przy oznaczeniu wytwarzania różnych toksyn, w tym także cereulidyny, jest wyższa i wynosi 30°-34°C. W temperaturze 12°-15°C szczepy wytwarzały znacznie więcej toksyny niż w temperaturze 30°C, jednak po dłuższym okresie inkubacji. Wydaje się to mieć szczególne znaczenie w odniesieniu do temperatury przechowywania produktów spożywczych.

Agata i wsp. (2) przeprowadzili badania nad wytwarzaniem cereulidyny przez szczepy *B. cereus* wyizolowane z różnych źródeł. Autorzy dowiedli, że produkcja toksyny była najwyższa po 20 godzinach inkubacji w temperaturze 30°C. Ze szczepów wyizolowanych z wymiocin ludzkich 71,2% wytwarzało powyżej 1 µg/cm³ tej toksyny. Maksymalna temperatura, w której odnotowano wytwarzanie cereulidyny to 37°C, pomimo że szczepy rozwijały się nawet w temperaturze 46°C. Jednakże wytwarzanie toksyny w temperaturze 37°C w porównaniu z niższą temperaturą jest minimalne. Świadczy to o tym, że w potrawach podgrzewanych przez dłuższy czas w temperaturze powyżej 37°C ryzyko wytwarzania cereulidyny przez *B. cereus* jest zminimalizowane.

Optymalna temperatura tworzenia toksyny to 21°C, natomiast wytwarzanie cereulidyny w temperaturze 8-10°C i powyżej 35°C jest nieznaczne (17).

Kolejnymi czynnikami, które mają wpływ na wytwarzanie cereulidyny, jest obecność tlenu i dostępność aminokwasów w środowisku. Jääskeläinen i wsp. (20) badali wpływ zmodyfikowanej atmosfery na zdolność do wytwarzania cereulidyny przez *Bacillus cereus* w przechowywanej żywności. W swym eksperymencie wykorzystali gotowaną czerwoną fasolę oraz ryż, do których wprowadzili inokulum kilku szczepów *Bacillus cereus* i przechowywali w temperaturze pokojowej w atmosferze azotu lub tlenu, a ilość cereulidyny mierzyli po 4 dniach. W przypadku przechowywania w atmosferze azotu ilość wytworzonej toksyny

w fasoli wynosiła 0,06-0,1 µg cereulidyny w 1 g w zależności od szczepu, a w ryżu – poniżej 0,05 µg cereulidyny w 1 g. Gdy ten sam eksperyment przeprowadzili w atmosferze tlenowej, poziom toksyny był znacznie wyższy i wynosił 0,5-1,7 µg cereulidyny w 1 g fasoli oraz 2-4 µg cereulidyny w 1 g ryżu, co wskazuje, że obecność tlenu w środowisku znacznie zwiększa ilość tworzonej toksyny. Pakowanie żywności w modyfikowanej atmosferze azotu może więc zapobiegać w znacznym stopniu powstawaniu cereulidyny w czasie przechowywania produktów spożywczych.

Agata i wsp. (3) określili wpływ tlenu na wytwarzanie cereulidyny w mleku. W próbkach mleka zaszczipionych toksynotwórczym szczepem *B. cereus*, które poddano wytrząsaniu, zahamowano rozwój drobnoustrojów, ale stwierdzono obecność cereulidyny (0,64 µg/g). W próbkach mleka, które nie były wytrząsane, następował proces jego ścinania, ale nie stwierdzono toksyny. Takie same obserwacje dotyczyły mleka sojowego.

Wpływ obecności w środowisku aminokwasów, takich jak L-leucyna czy L-walina na wytwarzanie toksyny wymiotnej przez szczepy *Bacillus cereus* jest znaczny. Potwierdzają to badania, w których udowodniono, że L-leucyna i L-walina są prekursorami cereulidyny (1, 25), a także badania Jääskeläinen i wsp. (20), którzy stwierdzili, że w ryżu z dodatkiem wymienionych aminokwasów toksynotwórcze szczepy *B. cereus* tworzyły w warunkach tlenowych dwukrotnie więcej cereulidyny niż w ryżu bez dodatku aminokwasów, chociaż obecność aminokwasów nie zwiększyła ilości wytwarzanej toksyny, kiedy próbki ryżu przechowywali w atmosferze azotu (99,5%). Dlatego też pakowanie produktów w modyfikowanej atmosferze azotu może istotnie zmniejszać ryzyko tworzenia toksyny w produktach spożywczych.

Cechy charakterystyczne szczepów *Bacillus cereus* tworzących cereulidynę

Hipotezę, że szczepy zdolne do tworzenia cereulidyny stanowią odrębną grupę szczepów różniących się uzdolnieniami biochemicznymi od pozostałych szczepów *Bacillus cereus*, postawili po raz pierwszy Agata i wsp. (2), którzy wykazali, że szczepy hydrolizujące skrobię nie wytwarzają toksyny wymiotnej.

Aktualnie udało się wykazać, że szczepy wytwarzające cereulidynę mają kilka wspólnych cech, m.in. nie wykorzystują skrobi i nie fermentują salicyny (13, 28), a także tworzą węższą strefę hemolizy na pożywce z krwią niż szczepy wytwarzające toksyny odpowiedzialne za formę biegunkową (4). Jak wykazali Svensson i wsp. (30), tylko łączne przeprowadzenie powyższych oznaczeń może być wystarczające do zidentyfikowania szczepów tworzących cereulidynę. Jako dodatkową cechę różnicującą podaje się także zdolność do rozkładu tyrozyny (szczepy tworzące cereulidynę w większości tej cechy nie posiadają) (6).

Panujące przez dłuższy czas przekonanie, że szczep *B. cereus* powodujące biegunkę nie mają zdolności tworzenia cereulidyny (2), okazało się niesłuszne. Stwierdzono, że wśród szczepów tworzących toksyny „biegunkowe” (toksyny HBL, NHE) część tworzy cereulidynę. Potwierdzać to mogą publikowane raporty z przypadków zatruc pokarmowych, w czasie których często pojawiają się jednocześnie objawy typowe zarówno dla zatrucia typu biegunkowego, jak i wymiotnego (28, 31).

Występowanie cereulidyny i szczepów tworzących cereulidynę w różnych produktach spożywczych

W Japonii opublikowano wyniki badań dotyczących występowania cereulidyny w różnych produktach spożywczych. Produkty spożywcze, które przebadano, były przyczyną zatruc pokarmowych o charakterze wymiotnym w Japonii w latach 1974-1999. W większości przebadanych próbek wykryto cereulidynę w ilości 0,01-1,3 µg w 1 g produktu. Produktami, które zawierały najwięcej toksyny były potrawy, w których głównym składnikiem był gotowany lub smażony ryż (3). Ten sam zespół naukowców przeprowadził badania polegające na określeniu tempa wzrostu i szybkości wytwarzania toksyny wymiotnej przez toksynotwórczy szczep *B. cereus* NC7401 w różnych produktach spożywczych. Do każdej z przygotowanych próbek dodano około 10^3 jtk/g produktu, a następnie przechowywano w temperaturze 30°C przez 24 godziny. Badany szczep najaktywniej rozwijał się i tworzył cereulidynę w ryżu (zwiększenie liczby jtk/g o 5 rzędów wielkości i 0,3 µg cereulidyny/g ryżu) i w makaronie (zwiększenie liczby jtk/g o 5 rzędów wielkości i 0,16 µg cereulidyny/g spaghetti). W produktach mlecznych, zawierających jaja czy tofu wzrost *B. cereus* był znacznie słabszy (zwiększenie liczby j.t.k./g o 3-4 rzędy wielkości), a ilość toksyny wymiotnej niewykrywalna w 1 g. Wysokie stężenie toksyny w potrawach z dużą ilością skrobi potwierdza dane epidemiologiczne, iż są to produkty w największym stopniu odpowiedzialne za wymiotne zatrucia pokarmowe. Warto zwrócić uwagę, że wytwarzanie cereulidyny w potrawach skrobiowych zachodzi w temperaturze pokojowej w krótkim czasie (24 godziny).

Występowanie szczepów wytwarzających cereulidynę w mleku i jego produktach nie jest szeroko opisane. Kilka publikacji wskazuje równocześnie, że mleko jest odpowiednim substratem do tworzenia cereulidyny, ale w warunkach optymalnych (temperatura pokojowa), a więc nietypowych dla przechowywania tego rodzaju produktu (2, 3, 14).

Svensson i wsp. (30) przebadali 5668 izolatów *B. cereus* pochodzących z mleka surowego, środowiska jego pozyskiwania oraz środowiska produkcyjnego mleczarni w kierunku zdolności wytwarzania cereulidyny. Wśród szczepów pochodzących ze środowiska, żaden nie okazał się szczepem zdolnym tworzyć cereulidynę. Szczepy zdolne do tworzenia cereulidyny

stanowiły do 3,8% szczepów pochodzących z mleka surowego i tylko do 0,05% szczepów wyizolowanych z linii produkcyjnych. Ilość wytwarzanej cereulidyny wahała się od 0,01 do 2,3 µg toksyny na 1 mg biomasy bakteryjnej.

Szczepy zdolne do tworzenia cereulidyny wyizolowano z produktów do żywienia niemowląt i dzieci (4, 13, 29). Wykazano także możliwość powstawania do 200 µg cereulidyny na 100 ml rekonstruowanych odżywek dla niemowląt w czasie ich przechowywania przez 24 godziny w temperaturze pokojowej (29). Liczebność około 10^6 jtk szczepów cereulidynotwórczych w 1 gramie żywności była związana ze stężeniem toksyny 10 µg cereulidyny/100 gram produktu (29). Jak podaje Becker i wsp. (7), w odżywece dla niemowląt naturalnie zanieczyszczonej na poziomie 100 jtk *B. cereus* w 1 g po jej przygotowaniu i przechowaniu przez 7-9 godzin w temperaturze pokojowej, liczba patogenów może sięgnąć 10^6 jtk/100 ml, co według Shaheen i wsp. (29) może wiązać się z powstaniem istotnych ze względów zdrowotnych ilości cereulidyny.

Apetroaie i wsp. (6) zbadali zdolności tworzenia cereulidyny u 24 szczepów wyizolowanych z produktów spożywczych, żywności będącej przyczyną zatruc pokarmowych, z treści jelitowej ludzi. Dwa szczepy określili jako bardzo silnie toksyczne (0,6-1,8 µg cereulidyny/mg biomasy komórkowej), siedem – o umiarkowanej toksyczności (0,18-0,6 µg cereulidyny/mg biomasy), cztery – o słabej (0,02-0,16 µg cereulidyny/mg biomasy), a jedenaście szczepów nie tworzyło cereulidyny.

Zatrucia pokarmowe wywołane przez cereulidynę u ludzi i zwierząt

Bacillus cereus wywołuje 1-23% zatruc pokarmowych pochodzenia bakteryjnego odnotowywanych na świecie (16). Są to zarówno zatrucia typu biegunkowego, jak i wymiotnego. W latach 1950-1985 najczęściej zatruc typu wymiotnego odnotowano w Japonii, Norwegii i na Wyspach Brytyjskich. Odsetek chorób wywołanych przez *Bacillus cereus* rozkłada się różnie w poszczególnych krajach. Analiza zatruc pokarmowych wśród żołnierzy w Niemczech wykazała, że *Bacillus cereus* był najczęściej izolowanym patogenem w próbkach posiłków podawanych w stołówkach, a drobnoustroje te były odpowiedzialne za 42% zatruc pokarmowych wśród żołnierzy w latach 1985-2000 (23).

Z dostępnych danych wynika, iż zatrucia cereulidyną wywołane przez mleko czy jego produkty są niezwykle rzadkie i odnotowano pojedyncze przypadki w Europie oraz jedno większe ognisko w Japonii, gdzie po spożyciu zanieczyszczonego mleka zachorowało 201 osób. Opisane są także przypadki śmiertelne zatruc cereulidyną obecną w potrawach mącznych (11, 27).

Przebieg zatrucia typu „wymiotnego” jest uzależniony od wieku oraz sposobu życia osoby, która spożyła pokarm zawierający cereulidynę. Dokładne i rze-

czywiste dane dotyczące liczby zatruc wywołanych przez *B. cereus* są zapewne wyższe, gdyż często zatrucia te mylnie kwalifikowane są, ze względu na podobieństwo objawów, jako zatrucia gronkowcowe. Tylko 2% przypadków zatruc pokarmowych, które na podstawie objawów zakwalifikowano jako wywołane enterotoksyną *Staphylococcus aureus*, okazało się takimi faktycznie po wykonaniu badań wykrywających obecność tej enterotoksyny w próbkach żywności. W pozostałych przypadkach przyczyny zatrucia pozostały nieokreślone. Ze względu na krótki czas trwania zatrucia typu wymiotnego często zatrucia takie nie są zgłaszane przez chorych do organów służby zdrowia, co także wpływa na obniżenie oficjalnych danych (13).

Metody wykrywania cereulidyny

Wszystkie znane metody wykrywania cereulidyny z wykorzystaniem kultur tkankowych oparte są na wykorzystaniu działania cereulidyny polegającego na wakuolizacji mitochondriów komórek, co obserwuje się zwykle mikroskopowo.

Test wakuolizacji komórek Hep-2 (komórki ludzkiego nowotworu krtani) został opracowany przez Hughesa i wsp. (19) i udoskonolony przez Finlay i wsp. (15). Jest to metoda najczęściej do tej pory stosowana, a oparta na wykorzystaniu faktu, że cereulidyna powoduje wakuolizację mitochondriów komórek Hep-2, co obserwuje się wizualnie pod mikroskopem po 24-godzinnej inkubacji próbek.

Metoda wykrywania cereulidyny przy użyciu spermy knura po raz pierwszy została opisana przez Andersson i wsp. (5). Test jest oparty na mikroskopowej obserwacji ruchliwości plemników po 24-godzinnej inkubacji z bezkomórkowym filtratem z hodowli badanego szczepu *B. cereus* lub filtratem próbek żywności. Cereulidyna powoduje zahamowanie ruchów plemników wywołane wakuolizacją mitochondriów. W kolejnych latach ten sam zespół naukowców (4, 18) udoskonalił tę metodę, zwiększając czułość plemników na cereulidynę, dzięki czemu zminimalizowano ilość wykorzystywanej biomasy bakteryjnej i objętość odczynników. Proóg wykrywalności cereulidyny wynosi w tej metodzie $0,3 \pm 1$ ng cereulidyny na $0,2$ cm³ spermy, a końcowe wyniki otrzymuje się w czasie 30 minut.

Podobną wrażliwość na cereulidynę wykazują komórki nabłonka okrężnicy, komórki nerwowe i komórki płuc (22), jednakże ze względu na łatwiejszą dostępność, to właśnie sperma knura wydaje się najwygodniejszym modelem komórkowym do analiz w kierunku obecności toksyny wymiotnej *B. cereus*. Metoda ta znalazła zastosowanie do wykrywania i analizy ilościowej cereulidyny w produktach żywnościowych (5, 21, 22).

Finlay i wsp. (15) opracowali szybką spektrofotometryczną metodę oznaczenia cereulidyny opartą na wykorzystaniu bromku 3-(4,5-dimetylotiazo-2-ilo)-2,5-difenylotetrazoliowego (MTT). Jest to żółta, roz-

puszczalna w wodzie sól, która przez metabolizujące komórki (HEp-2) konwertowana jest do nierozpuszczalnego farmazanu o barwie purpurowej. Obecność toksyny upośledza tę konwersję.

Kawamura-Sato i wsp. (24) opracowali metodę oznaczania cereulidyny, w której wykorzystali zjawisko hamowania przez cereulidynę procesu oddychania w mitochondriach komórek wątrobowych szczura (brak zmniejszania się stężenia tlenu w środowisku). Zależność pomiędzy szybkością zużycia tlenu i stężeniem cereulidyny pozwala na ilościowe oznaczenie toksyny wymiotnej. Minimalne stężenie toksyny powodujące zahamowanie procesu oddychania w mitochondriach wynosi 50 ng/cm³.

Dopiero kilka lat temu udało się zidentyfikować fragment DNA odpowiadający za tworzenie enzymu syntetazy cereulidyny (gen *ces*) (12, 13), co pozwoliło opracować primery służące do identyfikacji szczepów toksynotwórczych metodą PCR.

Zawartość cereulidyny może być także określana z zastosowaniem chromatografii cieczowej i spektroskopii masowej z pułapką jonową w oparciu o specyficzne dla cereulidyny jony o m/z: 1153,8 (addukt H⁺), 1170,0 (addukt NH₄⁺), 1176,0 (addukt Na⁺), 1191,7 (addukt K⁺). Proóg wykrywalności tej metody wynosi $0,2$ mg cereulidyny na 1 mg biomasy komórkowej (17). Stosowano ją do określenia optymalnych warunków tworzenia cereulidyny oraz do określenia zjadliwości szczepów wyizolowanych z próbek żywności oraz przypadków zatruc pokarmowych (6, 17, 30).

Pomimo niebezpieczeństwa występowania zatruc wymiotnych wywoływanych przez cereulidynę, w Polsce nie prowadzi się żadnych statystyk odnośnie do tego typu zachorowań. Na świecie problem ten już od lat jest obserwowany i prowadzone są działania w kierunku ograniczenia liczby zatruc typu wymiotnego wywołanych przez *Bacillus cereus*.

Piśmiennictwo

1. Agata N., Mori M., Ohta M., Suwan S., Ohtani I., Isobe M.: A novel dodeca-peptide, cereulide, isolated from *Bacillus cereus* causes vacuole formation in Hep-2 cells. *FEMS Microbiol. Lett.* 1994, 121, 31-35.
2. Agata N., Ohta M., Mori M., Isobe M.: Production of an emetic toxin, cereulide, is associated with a specific class of *Bacillus cereus*. *Curr. Microbiol.* 1996, 33, 67-69.
3. Agata N., Ohta M., Yokoyama K.: Production of *Bacillus cereus* emetic toxin (cereulide) in various foods. *J. Clin. Microbiol.* 2002, 73, 23-27.
4. Andersson M., Jääskeläinen E., Shaheen R., Pirhonen T., Wijnands L., Salkinoja-Salonen M.: Sperm bioassay for rapid detection of cereulide-producing *Bacillus cereus* in food and related environments. *Int. J. Food Microbiol.* 2004, 94, 175-183.
5. Andersson M., Mikkola R., Helin J., Andersson M., Salkinoja-Salonen M.: A novel sensitive bioassay for detection of *Bacillus cereus* emetic toxin and related depsipeptide ionophores. *Appl. Environm. Microbiol.* 1998, 64, 1338-1343.
6. Apetroaie C., Andersson M., Spröer C., Tsitko I., Shaheen R., Jääskeläinen E., Wijnands L., Heikkilä R., Salkinoja-Salonen M.: Cereulide-producing strains of *Bacillus cereus* show diversity. *Arch. Microbiol.* 2005, 184, 141-151.
7. Becker H., Schaller G., Wiese W., Terplan G.: *Bacillus cereus* infant foods and dried milk products. *Int. J. Food Microbiol.* 1994, 23, 1-5.
8. Berthold A., Molska I.: Występowanie *Bacillus cereus* w mleku surowym. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość.* 2002, Supl. (32) 3, 8-12.
9. Berthold A., Molska I.: Występowanie *Bacillus cereus* w środowisku pozyskiwania mleka. *Medycyna Wet.* 2004, 60, 42-44.

10. Berthold A., Gibowicz H.: Występowanie *Bacillus cereus* w rynkowych produktach mleczarskich. *Przeegl. Mlecz.* 2005, 12, 4-7.
11. Dierick K., Van Collie E., Swiecicka I., Meyfroidt G., Devlieger H., Meulemans A., Hoedemaekers G., Fourie L., Heyndrickx M.: Fatal family outbreak of *Bacillus cereus* – associated food poisoning. *J. Clin. Microbiol.* 2005, 43, 8, 4277-4279.
12. Ehling-Schulz M., Fricker M., Scherer S.: Identification of emetic toxin producing *Bacillus cereus* strains by a novel molecular assay. *FEMS Microbiol. Lett.* 2004, 232, 189-195.
13. Ehling-Schulz M., Vukov N., Schulz A., Shaheen R., Andersson M., Märtilbauer E.: Identification and partial characterization of the nonribosomal peptide synthetase gene responsible for cereulide production in emetic *Bacillus cereus*. *Appl. Environm. Microbiol.* 2005, 71, 1, 105-113.
14. Finlay W., Logan N., Sutherland A.: *Bacillus cereus* produces most emetic toxin at lower temperatures. *Lett. Appl. Microbiol.* 2000, 3, 385-389.
15. Finlay W., Logan N., Sutherland A.: Semiautomated metabolic staining assay for *Bacillus cereus* emetic toxin. *Appl. Environm. Microbiol.* 1999, 65, 4, 1811-1812.
16. Granum P.: *Bacillus cereus*, [w:] Fratamico P., Bhunie A., Smith J. (red.): *Foodborne Pathogens. Microbiology and Molecular Biology.* Caister Academic Press Norfolk 2005, 409-419.
17. Häggblom M., Apetroaie C., Andersson M., Salkinoja-Salonen M.: Quantitative analysis of cereulide, the emetic toxin of *Bacillus cereus*, produced under various conditions. *Appl. Environm. Microbiol.* 2002, 68, 2479-2483.
18. Hoornstra D., Andersson M., Mikkola R., Salkinoja-Salonen M.: A new method for in vitro detection of microbially produced mitochondrial toxins. *Toxicology in Vitro* 2003, 17, 745-751.
19. Hughes S., Bartholomew B., Hardy J., Kramer J.: Potential application of a Hep-2 cell assay in the investigation of *Bacillus cereus* emetic-syndrome food poisoning. *FEMS Microbiol. Lett.* 1989, 52, 7-12.
20. Jääskeläinen E., Häggblom M., Andersson M., Salkinoja-Salonen M.: Atmospheric oxygen and other conditions affecting the production of cereulide by *Bacillus cereus* in food. *Int. J. Food Microbiol.* 2004, 96, 75-83.
21. Jääskeläinen E., Häggblom M., Andersson M., Vanne L., Salkinoja-Salonen M.: Potential of bakery products for producing cereulide, the *Bacillus cereus* emetic toxin: quantitative analysis by chemical and biological methods. *J. Food Prot.* 2003, 66, 6, 1047-1054.
22. Jääskeläinen E., Teplova V., Andersson M., Andersson L., Tammela P., Andersson M., Pirhonen T., Saris N., Vuorela P., Salkinoja-Salonen M.: In vitro assay for human toxicity of cereulide, the emetic toxin produced by food poisoning *Bacillus cereus*. *Toxicology In Vitro* 2003, 17, 737-744.
23. Kleer J., Bartholomä A., Levetzow R., Reiche T., Sinell H., Teufel P.: Bakterielle Lebensmittel-Infektionen und Intoxikationen in Einrichtungen zur Gemeinschaftsverpflegung 1985 bis 2000. *Arch. Lebensm. Hyg.* 2001, 73, 112-116.
24. Kawamura-Sato K., Hirama Y., Agata N., Ito H., Torii K., Takeno A., Hasegawa T., Shimomura Y.: Quantitative analysis of cereulide, an emetic toxin of *Bacillus cereus*, by using rat liver mitochondria. *Microbiol. Immunol.* 2005, 49, 1, 25-30.
25. Kuse M., Franz T., Koga K., Suwan S., Isobe M., Agata N., Ohta M.: High incorporation of L-aminoacids to cereulide, an emetic toxin from *Bacillus cereus*. *Bioorganic and Medicinal Chem. Lett.* 2000, 10, 735-739.
26. Lund T., De Buyser M., Granum P.: A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. *Molecular Microbiol.* 2000, 38, 254-261.
27. Mahler H., Pasi A., Kramer J., Schulte P., Scoging A., Bar W., Krahenbuhl S.: Fulminant liver failure in association with the emetic toxin of *Bacillus cereus*. *New England J. Med.* 1997, 336, 1142-1148.
28. Pirttijärvi T., Andersson M., Scoging A., Salkinoja-Salonen M.: Evaluation of methods for recognizing strains of the *Bacillus cereus* group with food poisoning potential among industrial and environmental contaminants. *Syst. Appl. Microbiol.* 1999, 22, 133-144.
29. Shaheen R., Andersson M., Apetroaie C., Schulz A., Ehling-Schulz M., Ollilainen V., Salkinoja-Salonen M.: Potential of selected infant food formulas for production of *Bacillus cereus* emetic toxin, cereulide. *Int. J. Food Microbiol.* 2006, 107, 287-294.
30. Svensson B., Monthán A., Shaheen R., Andersson M., Salkinoja-Salonen M., Christiansson A.: Occurrence of emetic toxin producing *Bacillus cereus* in the dairy production chain. *Int. Dairy J.* 2006, 16, 740-749.
31. Toh M., Moffitt M., Henrichsen L., Raftery M., Barrow M., Cox J., Marquis C., Neilan B.: Cereulide, the emetic toxin of *Bacillus cereus*, is putatively a product of nonribosomal peptide synthesis. *J. Appl. Microbiol.* 2004, 97, 992-1000.

Adres autora: dr inż. Anna Berthold, ul. Nowoursynowska 159c, 02-787 Warszawa; e-mail: anna.berthold@wp.pl