

Przeżywalność *Bacillus cereus* w górnych odcinkach przewodu pokarmowego

ANNA BERTHOLD-PLUTA, ANTONI PLUTA, GRZEGORZ LESZCZ

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

Berthold-Pluta A., Pluta A., Leszcz G.

Survival of *Bacillus cereus* in the upper part of the gastrointestinal tract

Summary

The *Bacillus cereus* species of bacteria is commonly found in the environment, as well as in raw materials and foodstuffs. It may cause outbreaks of food-borne infections in humans. The course of the infection can be twofold: it can either take the form of intoxication – caused by ingestion of food containing *B. cereus* emetic toxin (cereulide) – or toxicoinfection, resulting from the presence of enterotoxic *B. cereus* strains in food which produce diarrheal type of toxins in the small intestine.

The ability of *B. cereus* to adapt to certain stress conditions, such as low pH, can influence their survival in the gastrointestinal tract, mainly the stomach. These bacteria can initially adapt to low pH in the course of food production or in the original environment of their occurrence, i.e. in the soil. This behavior leads to a higher acid resistance of the cells and, consequently, in the case of contaminated food ingestion, it may facilitate the transit of the pathogen to the upper gastrointestinal tract.

The article discusses various aspects of *B. cereus* survival inside the human gastrointestinal tract, paying special attention to its upper part. The issues of *B. cereus* capacity to counter adverse environmental conditions inside the human stomach, as well as the so called cross-resistance of the bacteria have been elucidated. The following factors have been taken into consideration: the biological state of bacteria (vegetative or spore form), growth temperature profile, phases of vegetative cell growth, as well as the possible prior exposure of the bacteria to low pH. The influence of these factors on the resistance of *B. cereus* spores and vegetative forms to high acidity has been examined. Finally, the effect of digestive enzymes (pepsin) on the survival of *B. cereus* spores and vegetative forms in the medium simulating the human stomach environment have been analyzed.

Keywords: *Bacillus cereus*, survival, stomach

Bacillus cereus to bakterie G(+), względnie beztlenowe, powszechnie występujące w środowisku, skąd mogą przedostawać się do surowców i produktów spożywczych. Są izolowane z produktów pochodzenia zwierzęcego, produktów zbożowych, przypraw i produktów gotowych do spożycia (4, 9, 25, 29), w których dzięki występowaniu w obrębie gatunku szczepów psychrotrofowych (1, 3) znajdują warunki rozwoju.

Niektóre szczepy *B. cereus* po spożyciu zanieczyszczonej tymi patogenami żywności mogą wywoływać u ludzi zatrucia pokarmowe. Wyróżnia się dwa typy zatrucia wywołanych przez *B. cereus*: o przebiegu biegunkowym lub wymiotnym. Te pierwsze powodowane są przez enterotoksyny wytwarzane przez komórki *B. cereus* w jelicie cienkim, natomiast zatrucie typu wymiotnego wywołane jest spożyciem pokarmu już zawierającego toksynę – cereulidynę.

Zatrucie typu biegunkowego, z racji swej specyfiki, zależy w głównej mierze od przeżywalności *B. cereus*

w przewodzie pokarmowym człowieka. Do czynników limitujących w największym stopniu tę przeżywalność należą niskie pH występujące w żołądku i obecność enzymów trawiennych oraz żółć znajdująca się w jelicie cienkim i obecność w nim mikroflory autochtonicznej w dolnych odcinkach przewodu pokarmowego człowieka. W wywoływaniu zatruc pokarmowych przez *B. cereus* duże znaczenie ma także zdolność adherowania przetrwalników tego gatunku do komórek nabłonka jelitowego oraz ewentualne interakcje między komórkami wegetatywnymi *B. cereus* a enterocytami, co umożliwiłoby omawianym drobnoustrojom zasiedlanie środowiska jelit.

Wpływ niskiego pH i pepsyny na przeżywalność *Bacillus cereus*

W żołądku na czczo panuje niskie pH (średnie pH około 2,0), jednak w czasie spożywania pokarmu może osiągnąć wartości w zakresie 4,5-5,0 (12). Przy takich

podwyższonych wartościach pH oprócz przetrwalników także komórki wegetatywne mogą przetrwać warunki panujące w żołądku i w konsekwencji dotrzeć do jelita cienkiego. Skrócenie czasu przebywania trawionego pokarmu w żołądku lub występowanie w pożywieniu związków ochronnych może dodatkowo ułatwić komórkom wegetatywnym *B. cereus* pokonanie bariery niskiego pH soku żołądkowego.

Bakterie zdolne są przetrwać zabójcze (teoretycznie) dla siebie warunki np. niskiego pH, jeśli są wcześniej „zahartowane” oddziaływaniem tychże bodźców, ale o mniejszej skali. Może to stwarzać poważne problemy dla bezpieczeństwa żywności, gdyż bakterie, jeśli przetrwają czynniki stresu, na które napotykają w czasie produkcji żywności – np. obróbkę cieplną, odwadnianie czy zakwaszanie – zyskują większą oporność na te czynniki. Pewne znaczenie dla tego zjawiska ma też oporność krzyżowa drobnoustrojów, która polega na zwiększeniu oporności na stres poprzez wcześniejszy kontakt komórki z innym czynnikiem stresu. Z tego względu szeroka wiedza o przystosowywaniu się bakterii – szczególnie tych będących przyczyną zatruc pokarmowych – do warunków stresu, wydaje się bardzo istotna.

W badaniach nad opornością szczepów *B. cereus* na niskie pH oraz zdolnością przystosowania się do wysokiej kwasowości środowiska stwierdzono, że szczepy przetrzymywane wstępnie w środowisku o pH 6,3 przez 40 minut wykazywały wyraźne zwiększenie przeżywalności w pH 4,6 przez 20 minut. Liczba bakterii była nawet milion razy większa w porównaniu do liczebności komórek poddanych od razu działaniu pH 4,6 (5).

Faza wzrostu bakterii, w tym *B. cereus*, jest istotnym czynnikiem warunkującym zdolność przeżycia w niesprzyjającym środowisku. Komórki wegetatywne *B. cereus* w fazie zatrzymania wykazują pewną oporność na pH 4,6-5,0, we wstępnej i środkowej części fazy logarytmicznej są najbardziej wrażliwe na działanie kwasu (przeżywalność ~0,02%), natomiast w fazie nasycenia ich oporność gwałtownie rośnie (przeżywalność nawet 100%) (5, 14). Przykładowo: wartości D (czas w minutach konieczny do zmniejszenia liczby drobnoustrojów o 1 jednostkę logarytmiczną w konkretnym pH) określone przy pH 4,0 dla komórek *B. cereus* w fazie nasycenia wahały się od 9 do 38 minut, natomiast dla komórek w fazie logarytmicznej – od 3 do 10 minut (32). Psychrotrofowość szczepu nie wpływa na kwasooporność komórek w fazie nasycenia (30).

Nie stwierdzono wpływu inkubacji w warunkach podwyższonej kwasowości na zdolność kiełkowania przetrwalników *B. cereus* (2, 30).

Zaobserwowano wpływ obecności pepsyny (1,0 g/l) na komórki *B. cereus* w fazie nasycenia w bulionie o pH~4,0, przy czym wartości D dla szczepów psychrotrofowych zmniejszyły się bardziej niż szczepów mezofilnych. Wpływ pepsyny na komórki w logaryt-

micznej fazie wzrostu w pH~4,5 był odwrotny, a mianowicie dodatek pepsyny zwiększał wartość D o około 60%. Wpływ pepsyny zmniejszał się wraz ze wzrostem pH, co może mieć związek z optymalnym pH aktywności tego enzymu (pH 1,2-2,5) (30).

Neosynteza białek wpływa na oporność kwasową *B. cereus*. Dodatek 70 µg/ml chloramfenikolu, czyli antybiotyku, który hamuje syntezę białek bakteryjnych, zmniejszał oporność komórek *B. cereus* na kwasowość środowiska (pH 5,5) bez względu na wcześniejszą ich adaptację (28).

Podobnie jak w przypadku innych niekorzystnych warunków, również subletalne warunki kwasowości środowiska mogą wywoływać odpowiedź adaptacyjną u bakterii, która działa ochronnie w czasie ewentualnej ekspozycji na zabójczo niskie pH. Ten mechanizm znany jako ATR (acid tolerance response), czyli odpowiedź tolerancji na kwasowość, opisano u wielu bakterii patogennych oraz bytujących w ludzkim przewodzie pokarmowym (19). Mechanizm ATR jest ważnym elementem przystosowania się patogenów jelitowych do przeżycia pasażu przez żołądek i zwiększa ich wirulencję (21, 24). Komórki wegetatywne *B. cereus* również taki mechanizm posiadają (14, 28). Odpowiedź komórki na stres kwasowy może obejmować: aktywność ATP-azy lub dekarboksylazy glutaminianowej, która jest związana z homeostazą wewnątrzkomórkowego pH, modyfikacje metaboliczne i syntezę białek w celu ochrony lub naprawy makrocząsteczek (11).

Mechanizm homeostazy pH odpowiada za utrzymanie wewnętrznego pH komórki na wyższym poziomie niż pH środowiska ($pH_i > pH_o$) (5). Mechanizm homeostazy pH_i u *B. cereus* indukowany jest przy pH_o poniżej 6,0 (28). Podobne wyniki otrzymano dla innych bakterii Gram-dodatnich (11, 23).

W odpowiedzi na stres komórka bakteryjna wytwarzać może również szereg białek ochronnych lub naprawczych. Białka te należą do dwóch kategorii: białek specyficznych dla jednego rodzaju szoku i białek wytwarzanych w przypadku reakcji na różne stresy. Białka wytwarzane jako reakcja na stres kwasowy (ASP acid shock proteins) należą do obu wymienionych kategorii (13). U *B. subtilis* zidentyfikowano białko regulatorowe σ^{II} , które odpowiada za ekspresję białek ASP (18).

Wstępna hodowla komórek *B. cereus* TZ 415 przy pH 6,0, 5,5 i 5,0 powodowała zwiększenie przeżywalności komórek 10-, 10³- i 10⁴-krotne w pH 4,0 w porównaniu ze wstępną hodowlą w pH obojętnym (14). Komórki hodowane w sprzyjających warunkach nie są dostatecznie przygotowane na szok, jakim jest oddziaływanie np. pH 4,0. Komórki *B. cereus* o dodatniej ΔpH ($pH_i > pH_o$) cechowała zdecydowanie lepsza umiejętność przeciwdziałania stresowi niż tych z ujemną wartością ΔpH . Dodatkowo ΔpH sprzyja przedostawaniu się protonów do wnętrza komórki oraz syntezę ATP, który dostarcza komórce niezbędnego zapasu

energii. Stwarza to sprzyjające warunki do sprostania negatywnym czynnikiem, takim jak niskie pH środowiska (5, 28).

Ogólna odpowiedź na stres kwasowy u *B. cereus* obejmowała zmiany metabolizmu pirogronianu z aktywacją szlaku fermentacji butanediolu. Natomiast specyficzna odpowiedź na obecność kwasu mlekowego i octowego w środowisku obejmowała modyfikacje w obrębie szlaku metabolizmu aminokwasów (20). Wykazano, że adaptacja do niskiego pH u szczepu *B. cereus* ATCC 14579 była wzmocniona w obecności glutaminianu, argininy i lizyny, a obecność agmatyny, która jest inhibitorem dekarboksylazy argininy, ograniczała przeżywalność komórek i utrzymanie homeostazy pH_i w czasie szoku kwasowego (26).

W przemyśle spożywczym w procesach technologicznych wykorzystuje się różne kwasy organiczne, czy to dodawane specjalnie, jak kwas cytrynowy do napojów, kwas octowy do marynat, czy też występujące naturalnie w surowcu lub wytwarzane w czasie produkcji, jak kwas mlekowy (przemysł owocowo-warzywny i mleczarski). Są one niezbędne przy produkcji niektórych asortymentów wyrobów spożywczych, a dodatkowo zapobiegają rozwojowi bakterii chorobotwórczych w gotowym produkcie.

Kwas mlekowy, octowy, propionowy i cytrynowy były, w podanej kolejności, najbardziej zabójcze dla *B. cereus* bez względu na wstępną adaptację komórek, a wstępne narażenie na niskie pH w różnym stopniu zwiększało oporność *B. cereus*, w zależności od kwasu. Dla kwasów propionowego i winowego oporność komórek zaadaptowanych zwiększała się około 1000-krotnie, natomiast dla kwasu cytrynowego liczba żywych komórek różniła się tylko o 1 rząd logarytmiczny. Jedynie w obecności kwasu mlekowego obserwowano podobną reakcję komórek zaadaptowanych i niezaadaptowanych na niskie pH (6).

Przeżywalność zaadaptowanych na stres kwasowy komórek *B. cereus* była mniejsza w temperaturze 25°C niż w 4°C (6). Podobne zjawisko łącznego wpływu obniżenia temperatury i adaptacji kwasowej na wzmocnienie oporności na obniżone pH wykazano również dla innych patogenów (8, 16, 17). Ponadto komórki *B. cereus* zaadaptowane w niskim pH były mniej wrażliwe na działanie wysokiej temperatury niż niezaadaptowane. Adaptacja na stres kwasowy w pH 6,3/40 minut, pH 5,0/30 minut lub pH 5,5/120 minut powodowała wzrost tolerancji szczepów *B. cereus* na ogrzewanie (5, 7, 22).

Wykazano również, że czas adaptacji komórek *B. cereus* na subletalny zakres podwyższonej kwasowości miał negatywny wpływ na wytwarzanie toksyny HBL (7).

Wstępna ekspozycja na niskie pH zdecydowanie zwiększała kwasooporność *B. cereus*, a pH medium oraz wewnętrzne pH komórki miały kluczowe znaczenie. Komórka reagując na niskie pH, zwiększa ekspresję genów kodujących białka szokowe oraz chape-

rony (5, 11). Zwiększona tolerancja na środowisko kwasowe jest powiązana również m.in. ze wzmoczoną syntezą enzymów, takich jak dekarboksylaza argininy czy dekarboksylaza glutaminianu, które zaopatrują komórkę w CO₂ (15). Ponadto, czas działania oraz rodzaj obecnych kwasów organicznych także wpływały na oporność *B. cereus* na obniżone pH. Wszystkie te czynniki powinny być brane pod uwagę podczas dokładnej i szczegółowej analizy oraz oceny ryzyka w procesie technologicznym, szczególnie tam, gdzie zakwaszanie jest jedną z metod zapobiegania rozwojowi patogenów m.in. *B. cereus* (6, 7, 27, 28).

Przeżywalność *Bacillus cereus* w warunkach symulujących środowisko panujące w żołądku człowieka

Badania *in vitro* nad przeżywalnością bakterii w warunkach symulujących układ pokarmowy człowieka dotyczą głównie dwóch części przewodu pokarmowego, mianowicie żołądka oraz jelita cienkiego. Pozostałe części układu pokarmowego mają znikomy wpływ na żywotność *B. cereus* i z tego względu brak jest danych piśmiennictwa na ten temat.

W badaniach prowadzonych w bulionach o pH 1,0 symulujących sok żołądkowy z dodatkiem wywaru z mięsa, warzyw lub mleka, zmniejszenie liczby przetrwalników *B. cereus* nie przekraczające 1,5 rzędu wielkości stwierdzono jedynie w bulionie z dodatkiem warzyw (10). Natomiast w pozostałych dwóch bulionach nie stwierdzono żadnego spadku populacji bez względu na pH. Przy pH 5,0 we wszystkich bulionach następował około 10-krotny wzrost liczby bakterii, co oznacza, że przetrwalniki zdolne były do kiełkowania, a komórki wegetatywne do rozmnażania. Eksperymenty przeprowadzone na komórkach wegetatywnych przyniosły zgoła odmienne wyniki. W pH < 3,5 występował znaczny, wynoszący minimum 4 rzędy wielkości, spadek populacji bakterii bez względu na rodzaj bulionu hodowlanego. W bulionach o pH 5,0 bakterie mnożyły się, a ich liczba rosła średnio około 10-krotnie. Komórki wegetatywne cechowała największa oporność na niskie pH w bulionie zawierającym mleko. Wykazano także podobną przeżywalność komórek wegetatywnych, jak i przetrwalników w bulionie żołądkowym o pH > 4,5 zawierającym dodatek mleka. Efekt ochronny mleka tłumaczy się obecnością tłuszczu i białka, które tworząc kompleksy tłuszczowo-białkowe, mogą „więzić” bakterie, przez co nie są bezpośrednio narażone na wpływ niskiego pH. Podobne wyniki otrzymano w badaniach nad szczepami *B. cereus* wyizolowanymi z mleka (2) oraz nad szczepami wyizolowanymi z przypadków zatruc pokarmowych i żywności (31).

Wijnands i wsp. (32) opracowali model opisujący liczbę komórek wegetatywnych *B. cereus* przeżywiających pasaż przez żołądek u ludzi w różnym wieku na podstawie wyników eksperymentów przeprowadzonych w symulowanych warunkach soku żołądkowe-

go. Zgodnie z tym modelem, 3-12% spożytych komórek vegetatywnych *B. cereus* może przetrwać pasaż przez żołądek u ludzi młodych, a 6-26% u ludzi starszych, w zależności od fazy wzrostu komórek (wyższa przeżywalność w fazie nasycenia niż w fazie logarytmicznej) oraz szczepu.

Podsumowanie

Zdolność adaptacyjna *B. cereus* do stresogennych czynników, takich jak niskie pH, zwiększa ich przeżywalność w przewodzie pokarmowym, głównie w czasie przebywania w żołądku pokarmu zanieczyszczonego tymi patogenami. *B. cereus* mogą zostać wstępnie zaadaptowane do niskiego pH w pierwotnym środowisku np. w glebie lub w czasie produkcji żywności. Skutkuje to znacznie wyższą kwasoopornością komórek, co w konsekwencji może tym patogenom ułatwić pasaż przez żołądek.

Adaptacja do kwaśnego środowiska wzmacnia tolerancję kwasową *B. cereus*. Zwiększona oporność na niskie pH związana jest z syntezą białek w czasie adaptacji do kwaśnego środowiska. Ponadto, czas adaptacji i rodzaj kwasu organicznego wpływają na tolerancję kwasową tych bakterii. Czynniki te powinny być brane pod uwagę w ocenie ryzyka bezpieczeństwa zdrowotnego produktów spożywczych, do których utrwalania stosuje się metody zakwaszania biologicznego lub chemicznego.

Kwasowość w żołądku zmienia się w czasie spożycia pokarmu w zależności od jego składu i cech osobniczych człowieka. Kwasowość spada, kiedy pokarm dociera do żołądka i wraz z czasem zaczyna rosnąć do wartości zbliżonych do tych, jakie obserwuje się, gdy żołądek jest pusty. Kwasowość czynna w żołądku może osiągnąć wartości nawet ponad 4,0, a więc pH, które przeżywają komórki vegetatywne *B. cereus*. Liczba komórek, które opuszczają żołądek będzie się zatem zmniejszać wraz z czasem pasażu, który wynosi średnio około 2 godzin. Z tego powodu nie można wykluczyć udziału komórek vegetatywnych w patogeniezie syndromu biegunkowego, zwłaszcza w czasie pierwszych minut spożycia pokarmu, kiedy układ pokarmowy dopiero rozpoczyna optymalną pracę.

Piśmiennictwo

- Berthold A.: Możliwość wzrostu *Bacillus cereus* wyizolowanych z mleka i jego produktów w niskiej temperaturze. *Medycyna Wet.* 2007, 63, 471-475.
- Berthold A., Ramatowska J.: Przeżywalność enterotoksycznych *Bacillus cereus* w warunkach imitujących środowisko żołądka człowieka. *Medycyna Wet.* 2008, 64, 101-104.
- Berthold A., Rutkowska K.: Rozwój i tworzenie enterotoksyny HBL w mleku przez psychrotrofowe szczepy *Bacillus cereus* w niskiej temperaturze. *Medycyna Wet.* 2008, 64, 457-460.
- Berthold-Pluta A., Kurzyńska D.: Jakość mikrobiologiczna rynkowych przypraw i ziół. *Post. Tech. Przetwórstwa Spoż.* 2010, 2, 42-46.
- Browne N., Dowds B. C.: Acid stress in the food pathogen *Bacillus cereus*. *J. Appl. Microbiol.* 2002, 92, 404-414.
- Chen J.-L., Chiang M.-L., Chou C.-C.: Survival of the acid-adapted *Bacillus cereus* in acidic environments. *Int. J. Food Microbiol.* 2009, 128, 424-428.
- Chen J.-L., Chiang M.-L., Chou C.-C.: The effect of acid adaptation on the susceptibility of *Bacillus cereus* to the stresses of temperature and H₂O₂, as well as enterotoxin production. *Foodborne Pathogens Dis.* 2009, 6, 71-79.
- Cheng H. Y., Chou C. C.: Acid adaptation and temperature effect on the survival of *E. coli* O157:H7 in acidic fruit juice and lactic fermented milk products. *Int. J. Food Microbiol.* 2001, 70, 189-195.
- Choma C., Guinebretiere M. H., Carlin F., Schmitt P., Velge P., Granum P. E.: Prevalence, characterization and growth of *Bacillus cereus* in commercial cooked chilled foods containing vegetables. *J. Appl. Microbiol.* 2000, 88, 617-625.
- Clavel T., Carlin F., Lairon D., Nguyen-The C., Schmitt P.: Survival of *Bacillus cereus* spores and vegetative cells in acid media simulating human stomach. *J. Appl. Microbiol.* 2004, 97, 214-219.
- Cotter P. D., Hill C.: Surviving the Acid Test: Responses of Gram-Positive Bacteria to Low pH. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2003, 67, 429-453.
- Dressman J. B., Berardi R. R., Dermentzoglou L. C., Russell T. L., Scholtz S. P., Barnett J. L., Jarvenpaa K. M.: Upper gastrointestinal (GI) pH in young, healthy men and women. *Pharm. Res.* 1990, 7, 756-761.
- Foster J. W.: When protons attack: microbial strategies of acid adaptation. *Curr. Opin. Microbiol.* 1999, 2, 170-174.
- Jobin M. P., Clavel T., Carlin F., Schmitt P.: Acid tolerance response is low-pH and late-stationary growth phase inducible in *Bacillus cereus* TZ415. *Int. J. Food Microbiol.* 2002, 79, 65-73.
- Kobayashi H., Saito H., Kakegawa T.: Bacterial strategies to inhibit acidic environments. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 2000, 46, 235-243.
- Leyer G. J., Johnson E. A.: Acid adaptation promotes survival of *Salmonella* spp. in cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 1992, 58, 2075-2080.
- Leyer G. J., Wang L. L., Johnson E. A.: Acid adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 increases survival in acidic foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 1995, 61, 3752-3755.
- Liu J., Cosby W. M., Zuber P.: Role of Lon and ClpX in the post-translational regulation of a sigma subunit of RNA polymerase required for cellular differentiation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 1999, 33, 415-428.
- Merrel D. S., Camilli A.: Acid tolerance of gastrointestinal pathogens. *Curr. Opin. Microbiol.* 2002, 5, 51-55.
- Mols M., van Kranenburg R., Tempelaars M., van Schaik W., Moezelaar R., Abee T.: Comparative analysis of transcriptional and physiological responses of *Bacillus cereus* to organic and inorganic acid shocks. *Int. J. Food Microbiol.* 2010, 137, 13-21.
- O'Driscoll B., Gahan C. G., Hill C.: Adaptive acid tolerance response in *Listeria monocytogenes*: isolation of an acid-tolerant mutant which demonstrates increased virulence. *Appl. Environ. Microbiol.* 1996, 62, 1693-1698.
- Periago P. M., Van Schaik W., Abee T.: Identification of proteins involved in the heat stress response of *Bacillus cereus* ATCC 14579. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002, 68, 3486-3495.
- Rao M., Streuter T. L., Aldwell F. E., Cook G. M.: Intracellular pH regulation by *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium bovis* BCG. *Microbiol.* 2001, 147, 1017-1024.
- Riesenberg-Wilmes M. R., Bearson B., Foster J. W., Curtis R.: Role of the acid tolerance response in virulence of *Salmonella typhimurium*. *Inf. Immun.* 1996, 64, 1085-1092.
- Sarrias J. A., Valero M., Salmeron M. C.: Enumeration, isolation and characterization of *Bacillus cereus* strains from Spanish raw rice. *Food Microbiol.* 2002, 19, 589-595.
- Senouci-Rezkallah K., Schmitt P., Jobin M. P.: Amino acids improve acid tolerance and internal pH maintenance in *Bacillus cereus* ATCC 14579 strain. *Food Microbiol.* 2011, 28, 364-372.
- Sutherland J. P., Aherne A., Beaumont A. L.: Preparation and validation of a growth model for *Bacillus cereus*: the effects of temperature, pH, sodium chloride and carbon dioxide. *Food Microbiol.* 1996, 30, 359-372.
- Thomassin S., Jobin M. P., Schmitt P.: The acid tolerance response of *Bacillus cereus* ATCC14579 is dependent on culture pH, growth rate and intracellular pH. *Arch. Microbiol.* 2006, 186, 229-239.
- Torre Del M., Della Corte M., Stecchini M. L.: Prevalence and behaviour of *Bacillus cereus* in a REPFED of Italian origin. *Int. J. Food Microbiol.* 2001, 63, 199-207.
- Wijnands L. M., Dufrenne J. B., Leusden F. M. van: *Bacillus cereus*: characteristics, behavior in the gastro-intestinal tract and interaction with Caco-2 cells. The National Institute for Public Health and the Environment, Bilthoven 2005, Report RIVM 250912003/2005, QLK1-CT-2001-00854.
- Wijnands L. M., Dufrenne J. B., Zwietering M. H., Leusden F. M. van: Spores from mesophilic *Bacillus cereus* strains germinate better and grow faster in simulated gastro-intestinal conditions than spores from psychrotrophic strains. *Int. J. Food Microbiol.* 2006, 112, 120-128.
- Wijnands L. M., Pielat A., Dufrenne J. B., Zwietering M. H., Leusden F. M. van: Modeling the number of viable vegetative cells of *Bacillus cereus* passing through the stomach. *J. Appl. Microbiol.* 2009, 106, 258-267.

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