

Charakterystyka szczepów *Bacillus cereus* wyizolowanych z mleka surowego i środowiska jego pozyskiwania*)

ANNA BERTHOLD, ANTONI PLUTA, IRENA MOLSKA

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

Berthold A., Pluta A., Molska I.

Characteristics of the *Bacillus cereus* strains isolated from raw milk and the environment of milk production

Summary

The aim of this study was to identify certain biochemical features in 691 *B. cereus* strains isolated from raw milk and the environment of milk production. At the first stage of the study the following abilities were observed in all the examined strains: the fermentation of D-glucose in facultative anaerobic conditions, the production of acetylmethylcarbinol (Voges-Proskauer reaction), the reduction of nitrates to nitrites, the production of acid from D-xylose, L-arabinose, D-mannitol and galactose, the hydrolysis of casein, gelatine and tributyrin and the ability of haemolysis. At the second stage, 142 chosen strains were subject to a detailed analysis of biochemical features with the application of API 50CH and API 20E tests (BioMerieux Polska Sp. z o.o.).

The study confirmed the occurrence of the typical features for *B. cereus* as specified in Bergey's taxonomy in all the examined strains: i.e. the ability of gelatine and casein hydrolysis, the fermentation of D-glucose, the production of acetoin, the reduction of nitrates to nitrites, and the lack of the ability of D-xylose and L-arabinose fermentation. 27% of the examined strains had an ability of lactose fermentation, which is untypical for *B. cereus*. 72% of the strains had the ability of tributyrin hydrolysis.

Keywords: *Bacillus cereus*, milk

Bacillus cereus jest jednym z ważniejszych gatunków bakterii przetrwalnikujących obecnych w mleku surowym, a także środowisku jego pozyskiwania (3, 4). Drobnoustrój ten uważa się za jeden z najbardziej szkodliwych zwłaszcza w mleku spożywczym pasteryzowanym, gdyż może wywoływać zatrucia pokarmowe wskutek wytwarzania enterotoksyn, a także powodować różne wady produktów mleczarskich. W warunkach krajowych dotychczas nie prowadzono szerszych badań nad charakterystyką szczepów *Bacillus cereus* pochodzących ze środowiska oraz z surowców przemysłu spożywczego. W związku z tym za cel niniejszych badań przyjęto określenie wybranych cech biochemicznych i fizjologicznych różnych szczepów *B. cereus* wyizolowanych z mleka surowego oraz środowiska jego pozyskiwania.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na 691 szczepach *Bacillus cereus* wyizolowanych z mleka surowego oraz środowiska jego pozyskiwania, w dwóch etapach. Liczbę szczepów badanych w obu etapach oraz źródło ich pochodzenia zamieszczono w tab. 1. W etapie I u wszystkich 691 szczepów *B. cereus*

określono: zdolność fermentowania D-glukozy w warunkach względnie beztlenowych, wytwarzania acetylometylokarbinolu (acetoiny) (reakcja Voges-Proskauera), redukcji azotanów do azotynów (19), wytwarzania kwasu z D-ksylozy, L-arabi-

Tab. 1. Zestawienie liczby badanych szczepów *B. cereus*

Środowisko	Liczba badanych szczepów	
	Etap I	Etap II
Mleko surowe	152	28
Kał	221	40
Pasze	71	19
Ściółka	6	4
Powierzchnia strzyków	142	27
Powierzchnia kubków udojowych	38	7
Trawa	19	4
Gleba	29	5
Powietrze hali udojowej	8	4
Woda do mycia wymion	5	4
Razem	691	142

*) Badania wykonano w ramach grantu KBN 6 PO6G 03620.

nozy, D-mannitolu i galaktozy (2), zdolność hydrolizy kazeiny, żelatyny (5) i tributyriny oraz zdolność hemolizy.

Zdolność szczepów do hydrolizy tributyriny określono na pożywce Tributyrin Agar Base firmy Merck (nr kat. 1.01957). Badane szczepy posiewano rysowo eżą na podsuszoną pożywkę w płytkach Petriego i inkubowano w temperaturze 30°C ± 1°C przez 3 dni. Po tym czasie kolonie szczepów wykazujących zdolność do hydrolizy tributyriny otoczone były przezroczystą strefą.

Właściwości hemolityczne szczepów badano stosując gotowe płytki z podłożem Columbia z dodatkiem 5% krwi baraniej firmy Argenta Sp z o.o. (nr kat. PB 5039A). Szczepy *B. cereus* posiewano rysowo eżą na powierzchnię pożywki i inkubowano w temperaturze 30°C przez 24-48 godzin. Wystąpienie klarownych przejrzystych stref wokół wzrostu świadczyło o właściwościach hemolitycznych. Jako wynik negatywny przyjęto brak strefy hemolizy po 48 godzinach inkubacji.

W etapie II przeprowadzono szczegółowe badania cech biochemicznych z zastosowaniem testów API 50CH i API 20E (BioMerieux Polska Sp. z o.o.) oraz określono miano hemolizyn u wybranych 142 szczepów spośród 691 badanych szczepów zestawionych w tab. 1. Do drugiego etapu badań wybrano szczepy w sposób losowy tak, aby w etapie II znalazło się co najmniej 20% szczepów z każdego badanego środowiska, ale nie mniej niż 4 szczepy. Badania przeprowadzono ściśle według instrukcji producenta testów API 50CH i API 20E.

Do określenia miana hemolizyn zastosowano metodę opracowaną dla celów niniejszych badań. Do 25 cm³ bulionu mózgowo-sercowego firmy Merck (BHI, nr kat. 1.10493) w kolbach Erlenmayera przenoszono eżą niewielką ilość materiału 24-godzinnej hodowli wybranych szczepów. Kolby z zaszczipionym bulionem inkubowano w łaźni wodnej w temperaturze 32-35°C przez 16-18 godzin przy ciągłym wstrząsaniu (250 obr./min.). Następnie hodowle przesączano przez sączki mikrobiologiczne (Minisart, Ø 0,22 µm, Sartopol, nr kat. SM17597K), a z otrzymanego bezkomórkowego przesączu sporządzano szereg dwukrotnych rozcieńczeń w roztworze fizjologicznym. Z każdej próbki z przesączem nierozcieńczonym lub rozcieńczonym przenoszono po 0,1 cm³ do kolejnych jałowych 7 metalowych cylinderków (Ø 7 mm) umieszczonych na powierzchni pożywki z agarem Columbia z 5% dodatkiem krwi baraniej (Argenta Sp. z o.o., nr kat. PB 5039A). Płytki inkubowano w temperaturze 30°C, a wyniki odczytywano po 24 i 48 godzinach inkubacji. Klarowne strefy

Tab. 2. Wybrane cechy biochemiczne szczepów *B. cereus* określone w II etapie metodą API 50CH

Badany związek	Szczepy badane w niniejszej pracy	API 50 CHB*		Bergey's Manual (2)	Logan i Berkeley (11)	Rangasamy i wsp. (13)	Giffel i wsp. (9)
		<i>B. cereus</i> 1	<i>B. cereus</i> 2				
% szczepów fermentujących dany związek							
Glicerol	7	44	68	> 90	92	b.d.	100
Ryboza	82	98	93	b.d.	97	92	100
Galaktoza	14	7	1	b.d.	6	23	2
D-glukoza	100	100	100	> 90	100	100	100
D-fruktoza	99	99	100	b.d.	98	100	99
D-mannoza	49	23	1	b.d.	0	46	24
Inozytol	0	1	0	< 10	4	0	24
α-metylo-D-glukozyd	1	1	0	b.d.	2	0	2
N-acetylo-glukozoamina	99	96	100	b.d.	99	100	100
Amigdalina	18	21	31	b.d.	8	19	40
Arbutyna	91	80	85	b.d.	91	92	100
Eskulina	100	85	93	> 90	100	100	100
Salicyna	93	65	68	11-89	87	92	98
Celobioza	58	56	62	b.d.	84	27	96
Maltoza	100	100	100	> 90	98	100	100
Laktoza	27	5	0	< 10	8	15	1
Sacharoza	37	58	56	> 90	47	50	21
Trehaloza	100	100	93	> 90	98	100	100
Skrobia	45	100	0	> 90	96	89	98
Glikogen	47	96	0	b.d.	92	89	100
β-gentiobioza	5	3	1	b.d.	18	0	3
Turanoza	0	3	14	b.d.	15	0	0
Glukonian	12	33	62	b.d.	29	0	71

Objaśnienia: * – dane według API 50 CHB (Materiały BioMerieux Polska Sp. z o.o. 2001); b.d. – brak danych

fy wokół lub pod cylinderkami świadczyły o hydrolizie erytrocytów. Największe rozcieńczenie filtratu z hodowli, powodujące hydrolizę uznano za miano hemolizyn.

Wyniki i omówienie

Wybrane najważniejsze wyniki przeprowadzonych badań przedstawiono w tab. 2 i 3, które z pozostałymi omówiono w skrócie bezpośrednio w tekście.

Przeprowadzone badania wykazały występowanie w mleku i środowisku szczepów *B. cereus* o cechach typowych dla tego gatunku, ale także w pewnym stopniu zróżnicowanych, co charakteryzuje również inne drobnoustroje.

Wszystkie szczepy badane w etapie I fermentowały glukozę, wytwarzały acetylometylokarbinol (dodatnia reakcja w teście Voges-Proskauera) i redukowały azotany do azotynów lub wolnego azotu i na tej podstawie zostały zaliczone do *B. cereus* (19). Cechy, takie jak zdolność do tworzenia kwasu z glukozy (fermentacja), a brak tej zdolności w stosunku do D-ksylozy, L-arabinozy i D-

-mannitolu u ponad 99% szczepów oraz zdolność do hydrolizy kazeiny, żelatyny i do hemolizy u wszystkich badanych szczepów są zgodne z opisem gatunku *B. cereus* w Bergey's Manual (2). W wymienionym podręczniku brak jest danych, odnośnie do uzdolnień *B. cereus* do fermentacji galaktozy. Cechę tę określono w niniejszych badaniach i wykazano jej brak u około 99% szczepów.

Stwierdzono, że 59% szczepów *B. cereus* hydrolizowało tributyrinę. W Bergey's Manual (2) oraz w różnych publikacjach dotyczących charakterystyki *B. cereus* cecha ta nie jest wymieniona i w niniejszych badaniach określono ją po raz pierwszy.

W II etapie badań określono cechy biochemiczne u wybranych 142 szczepów *B. cereus* przy użyciu metody API 50CH i API 20E oraz miano hemolizyn. Wybrane wyniki oznaczeń oraz dla porównania wyniki uzyskane przez innych autorów zamieszczono w tab. 2.

Spośród badanych szczepów wszystkie fermentowały D-glukozę, maltozę i trehalozę oraz rozkładały eskulinę. Ponad 99% szczepów fermentowało D-fruktozę, N-acetyloglukozoaminę, ponad 90% – arbutynę i salicynę, ponad 80% – rybozę, 58% – celobiozę. Wyniki te wykazują dużą zgodność z danymi piśmiennictwa (2, 8, 10, 16).

Niektóre związki były fermentowane przez mniej niż 50% badanych szczepów, np. D-mannoza przez 49%, glikogen przez 47%, sacharoza – 37%, amigdalina – 18%, galaktoza – 14%, glukonian – 12% i glicerol – 7%. Dane dotyczące zdolności do fermentacji galaktozy, glicerolu, sacharozy i glukonianu otrzymane przez różnych autorów i przedstawione w tab. 2 wskazują na znaczne rozbieżności w tym zakresie, i należy sądzić, że nie są to cechy charakterystyczne dla *B. cereus*.

Omówienia wymagają wyniki dotyczące skrobi. Uzdolnienia do hydrolizy skrobi wykazywało tylko 48% badanych szczepów. Wynik ten nie jest w pełni zgodny z danymi piśmiennictwa (1, 2, 8, 10, 13, 16), według których skrobia była hydrolizowana przez co najmniej 90% szczepów. Uzdolnienia do hydrolizy skrobi zasługują na szczególną uwagę, gdyż m.in. Shinagawa (11) podał, że szczepy *B. cereus* wytwarzające toksynę wymiotną nie hydrolizują skrobi. Wśród szczepów wyizolowanych z produktów mleczarskich przez Te Giffella i wsp. (14) odsetek szczepów zdolnych do rozkładu skrobi wynosił tylko 59%. Jeszcze mniejszy odsetek szczepów (33%) fermentujących skrobię zaobserwowali Wong i wsp. (16). Trudność w ocenie wyników uzyskanych przez różnych autorów i w niniejszych badaniach może być spowodowana tym, że część autorów stosowała metodę API, a inni – metody tradycyjne, nie określając w metodyce badań, jaką stosowano skrobię.

Z danych przedstawionych w tab. 2 wynika, że tylko pojedyncze szczepy fer-

mentowały L-arabinozę, D-ksylozę, D-mannitol, α -metylo-D-mannozyd i α -metylo-D-glukozyd, melibiozę, β -gentiobiozę oraz D-tagatozę. Żaden badany szczep nie fermentował erytrytolu, D-arabinozy, L-ksylozy, adonitolu, β -metylo-ksylozydu, L-sorbozy, ramnozy, dulcytolu, inozytolu, sorbitolu, inuliny, melecytozy, rafinozy, ksylitolu, turanozy, D-liksozy, D- i L-fukozy, D- i L-arabitolu oraz 2- i 5-ketoglukonianu.

Ze względu na pochodzenie szczepów, na szczególną uwagę zasługuje zdolność fermentacji laktozy. W systematyce Bergey's Manual (2) podano, że *B. cereus* nie fermentuje laktozy, natomiast zarówno z danych API 50CHB, jak też z wyników prac autorów zamieszczonych w tab. 2 wynika, że niewielki odsetek szczepów *B. cereus* (do 15%) fermentuje ten cukier. W niniejszych badaniach zdolność fermentacji laktozy wykazało aż 27% szczepów. Około połowa tych szczepów została wyizolowana z mleka, natomiast pozostałe pochodziły z powierzchni strzyków, powierzchni kubków udojowych, kału (około 19% – dodatnich) i innych źródeł. Te Giffel i wsp. (15) zaobserwowali, że tylko mniej niż 1% szczepów pochodzących z mleka surowego i środowiska fermentowało laktozę. W późniejszych badaniach tych samych autorów (13, 14), ale nad szczepami *B. cereus* pochodzącymi z mleka surowego, pasteryzowanego oraz produktów mlecznych 11% do 23% szczepów fermentowało cukier mlekowy. Logan i Berkeley (8) oraz Rangasamy i wsp. (10) wykazali taką zdolność u 8% i 15% szczepów *B. cereus* pochodzących z mleka i produktów mlecznych. Wydaje się, że zróżnicowanie wyników w tym zakresie może wskazywać na nabywanie zdolności do fermentacji laktozy przez szczepy *B. cereus* znaj-

Tab. 3. Wybrane cechy biochemiczne szczepów *B. cereus* określone w II etapie metodą API 20E

Badana cecha	Szczepy badane w niniejszej pracy	API 20E *		Logani Berkeleyy (11)	Rangasamy i wsp. (13)
		<i>B. cereus</i> 1	<i>B. cereus</i> 2		
% szczepów dodatnich					
Fermentacja D-glukozy	100	100	100	100	100
β -galaktozydaza	3	3	1	0	0
Dihydrolaza argininy	58	71	56	60	62
Dekarboksylaza lizyny	2	0	0	0	0
Dekarboksylaza ornityny	1	0	1	0	0
Wykorzystanie cytrynianów	47	38	25	86	92
Wytwarzanie H ₂ S	0	0	0	b.d.	b.d.
Ureaza	13	9	0	0	0
Deaminaza tryptofanu	0	1	0	0	0
Wytwarzanie indolu	0	1	0	0	0
Wytwarzanie acetoiny (reakcja V-P)	99	24	25	92	58
Hydroliza żelatyny	100	98	100	100	100
Redukcja azotanów (łącznie wytwarzanie NO ₂ lub N ₂)	99	55	58	80	100

Objaśnienia: jak w tab. 2

dujące się w określonym środowisku lub na selekcję szczepów mających już tę cechę również w zależności od środowiska (np. obecności laktozy w mleku).

Wybrane wyniki badań przeprowadzonych przy użyciu testu API 20E przedstawiono w tab. 3. Należy zaznaczyć, że test API 20E wprowadzono w niniejszych badaniach jako pomocniczy, choć przeznaczony jest do charakterystyki przedstawicieli z rodziny *Enterobacteriaceae*.

Pod względem zdolności do fermentacji D-glukozy, wytwarzania acetylometylokarbinolu i redukcji azotanów potwierdzono całkowicie zgodność wyników z otrzymanymi w etapie I. Wśród cech, które można było określić tylko metodą API 20E, stwierdzono u wielu badanych szczepów zdolność hydrolizy argininy, wykorzystania cytrynianów oraz u niewielu – do wytwarzania ureazy. Odsetek szczepów wykazujących te cechy był zbliżony do tego, jaki charakteryzuje *B. cereus*. Pojedyncze badane szczepy wytwarzały dekarboksylazę lizyny i ornityny, a żaden szczep nie wytwarzał H₂S, indolu i deaminazy tryptofanu. Żaden szczep nie fermentował sorbitolu, ramnozy, inozytolu, melibiozy, tym samym wykazano zgodność pod tym względem wyników otrzymanych przy użyciu obu testów API.

Należy zwrócić uwagę na zdolność fermentacji D-mannitolu przez 4 szczepy *B. cereus*, co wykazały obydwie testy API. Brak tej cechy jest podstawą oznaczania *B. cereus* według PN-93/A-86034/14 (9). Okazuje się, że w nielicznych przypadkach metodyka ujęta w Polskiej Normie może dać błędny wynik z powodu występowania nietypowych szczepów *B. cereus* fermentujących D-mannitol; takie przypadki są jednakże rzadkie, a pozostałe testy potwierdzające przewidziane w wymienionej normie pozwalają uściślić wynik.

Według Bergey's Manual (2), jedną z charakterystycznych cech gatunku *Bacillus cereus* jest zdolność do hemolizy czerwonych krwinek. Wszystkie badane szczepy *B. cereus* wytwarzały hemolizyny, co już wykazano w etapie I, lecz miano hemolizyn było zróżnicowane. Najsilniejszą aktywnością hemolityczną odznaczało się 40% szczepów i ich miano hemolizyn wynosiło 1/32 i 1/64. Szczepy te pochodziły ze wszystkich badanych źródeł. Słabszą aktywność stwierdzono u 9 szczepów, u których miano hemolizyn wynosiło – 1/16, i u kolejnych 40 szczepów – 1/8. W przypadku 21% szczepów miano wynosiło zaledwie 1/4, u trzech szczepów – 1/2. Tak znaczne zróżnicowanie intensywności wytwarzania hemolizyn przez szczepy *B. cereus* występujące w środowisku naturalnym stwierdzono po raz pierwszy. Stec (12) na podstawie przeprowadzonych badań podał, iż tylko 15% szczepów *B. cereus* wyizolowanych z produktów spożywczych wykazywało silną aktywność hemolityczną wobec krwinek króliczych, natomiast spośród szczepów chorobotwórczych silne właściwości hemolityczne wykazywało aż 42,5% szczepów. Wszystkie szczepy badane w niniejszej pracy wykazywały właściwości hemolityczne w stosunku do erytrocytów baranich, podobnie jak szczepy wyizolowane z mleka pasteryzowanego przez Te Giffela i wsp. (14).

Podsumowanie

Badania potwierdziły występowanie cech typowych dla *B. cereus* wykazanych w systematyce Bergeya, do których zaliczyć można: zdolność do hydrolizy żelatyny i kazeiny, fermentowanie D-glukozy, wytwarzanie acetyloiny, redukcja azotanów do azotynów oraz brak zdolności do fermentowania L-arabinozy i D-ksylozy. Ze względu na pochodzenie badanych szczepów, tj. mleko surowe i środowisko jego pozyskiwania jako interesujące należy uznać zaobserwowanie u 27% badanych szczepów, a szczególnie szczepów wyizolowanych z mleka surowego nietypowej dla *B. cereus* zdolności do fermentowania laktozy. Zdolność hydrolizy tributyriny, którą oznaczono po raz pierwszy wykazywało 72% szczepów. Potwierdzono także zdolności badanego gatunku bakterii rozkładania czerwonych krwinek baranich. Równocześnie wykazano zróżnicowanie wśród szczepów ich aktywności hemolitycznej. Bardzo dużą aktywnością hemolizy charakteryzowało się 41% szczepów, a słabszą – 23% szczepów. Stwierdzono, że wśród szczepów należących do gatunku *B. cereus* występuje ogromna różnorodność zdolności do metabolizowania różnych związków, przy czym niektóre związki są metabolizowane tylko przez niewielki odsetek szczepów, a wiele związków nie jest metabolizowanych w ogóle.

Piśmiennictwo

1. *Angula L., Lorenzo A., Riveiro M.*: Isolation and identification of thermophilic flora of raw cow's milk from the province of Pontevedra. Mat. Sesji Modern Microbiological Methods for Dairy Products. Santander, Hiszpania 1989, s. 122-129.
2. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Tom 2, (Sneath P. H. A., Mair N. S., Sharpe M. E., Holt J. G. – red.). Williams and Wilkins, Baltimore 1986, 1104-1139.
3. *Berthold A., Molska I.*: Występowanie *Bacillus cereus* w mleku surowym. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość. 2002, 32, Supl., 8-17.
4. *Berthold A., Molska I.*: Występowanie *Bacillus cereus* w środowisku pozyskiwania mleka, Medycyna Wet. 2004, 60, 42-45.
5. *Burbianka M., Pliszka A., Burzyńska H.*: Mikrobiologia Żywności, PZW, Warszawa 1983, s. 460.
6. *Cosentino S., Mulargia A. F., Pisano B., Tuveri P., Palmas F.*: Incidence and biochemical characteristics of *Bacillus* flora in Sardinian dairy products. Int. J. Food Microbiol. 1997, 38, 235-238.
7. *Kramer J. M., Gilbert R. J.*: *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species, [w:] Doyle M. P. (red.): *Foodborne Bacterial Pathogens*. Marcel Dekker, Nowy Jork 1989, 21-70.
8. *Logan N. A., Berkeley R. C. W.*: Identification of *Bacillus* strains using the API system. J. Gen. Microbiol. 1984, 130, 1871-1882.
9. Polska Norma PN – 93/A – 86034/14. Mleko i przetwory mleczarskie. Badania mikrobiologiczne. *Bacillus cereus* – oznaczanie liczby metodą płytkową w temperaturze 30°C.
10. *Rangasamy P. N., Iyer M., Rogiński H.*: Isolation and characterization of *Bacillus cereus* in milk and dairy products manufactured in Victoria. Austr. J. Dairy Technol. 1993, 48, 93-95.
11. *Shinagava K.*: Serology and characterization of toxigenic *Bacillus cereus*. Neth. Milk Dairy J. 1993, 47, 89-103.
12. *Stec E.*: Intensywność wytwarzania hemolizyn i lecytynazy przez szczepy *Bacillus cereus* wyizolowane z żywności. Roczniki PZH 1990, 27, 194-198.
13. *Te Giffel M. C., Beumer R. R., Bonestroo M. H., Rombouts F. H.*: Incidence and characterization of *Bacillus cereus* in two dairy processing plants. Neth. Milk Dairy J. 1996, 50, 479-492.
14. *Te Giffel M. C., Beumer R. R., Granum P. E., Rombouts F. M.*: Isolation and characterization of *Bacillus cereus* from pasteurized milk in household refrigerators in the Netherlands. Intern. J. Food Microbiol. 1997, 34, 307-318.
15. *Te Giffel M. C., Beumer R. R., Slaghuis B. A., Rombouts F. M.*: Occurrence and characterization of (psychrotrophic) *Bacillus cereus* on farms in the Netherlands. Neth. Milk Dairy J. 1995, 49, 125-137.
16. *Wong H. C., Chen Y. L., Fan J. Y.*: Incidence and characterization of *Bacillus cereus* isolates contaminating dairy products. Appl. Environ. Microbiol. 1988, 54, 699-702.

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