

# Możliwość wzrostu *Bacillus cereus* wyizolowanych z mleka i jego produktów w niskiej temperaturze<sup>\*)</sup>

ANNA BERTHOLD

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

Berthold A.

## **Bacillus cereus strains isolated from raw milk, dairy products, the environment of milk production and their ability to grow in low temperatures**

Summary

The aim of this study was to identify the psychrotrophic *Bacillus cereus* strains in raw milk, in the environment of milk production and in chosen dairy products, as well as to examine the ability of the selected strains to grow in milk in lower temperatures. The study was conducted in 2 stages. At the first stage 821 strains were analyzed. They had been isolated from the following specimens: soil (29 strains), cow faeces (221), forage (90), the surface of teats (142), the surface of milking cups (38), raw milk (152), pasteurized milk (33) and mould cheese (116). All the analyzed strains were psychrotrophic (a growth in 6.5°C, over 10 days). At the second stage of the study 35 *B. cereus* strains, isolated from raw milk and the environment of milk production, were analyzed. It was observed that those strains have an ability to grow in milk stored at the temperature of 4°C, 6°C and 8°C over 7 days. The psychrotrophic features were observed in 3% of the strains isolated from the surface of the milking cups, 3% – cow faeces, 7% – soil, 7% – forage, 25% – raw milk, 12% – pasteurized milk and 17% – mould cheese. The growth of 5.7%, 11.4% and 45.7% strains respectively was noted in the milk stored in the temperatures of 4°C, 6°C and 8°C. The highest permissible temperature for the storage of pasteurized milk in Poland are: 8°C in trade and 6°C in transport. However, these temperatures are not low enough to guarantee product safety, because the growth of the psychrotrophic *B. cereus* strains is possible in such conditions.

**Keywords:** *Bacillus cereus*, milk

Wiele publikacji naukowych zawiera dane świadczące o możliwości rozwoju *Bacillus cereus* w niskiej temperaturze i ujemnym jego wpływie na trwałość i jakość mleka pasteryzowanego oraz innych produktów mleczarskich. Nawet niewielka początkowa liczba przetrwalników szczepów psychrotrofowych może wpływać ujemnie na trwałość mleka pasteryzowanego. Gatunek ten izolowano z mleka surowego i środowiska jego pozyskiwania (5, 6), a także z produktów mlecznych (3). Uważany jest on także za jeden z najbardziej szkodliwych ze względu na wywoływanie zatruc pokarmowych wskutek wytwarzania enterotoksyn w żywności (zatrucia typu „wymiotnego”) albo w jelicie cienkim człowieka (zatrucia typu „biegunkowego”) (1, 8, 12, 13, 16, 19, 22, 24). Wykazano, że szczepy *B. cereus* pochodzące z różnych źródeł rozwijały się w mleku przetrzymywanym w temperaturze 10°C, 7°C, 5°C, a nawet 2°C (12, 19). W warunkach krajowych badania z tego zakresu są nieliczne (4).

Celem badań było określenie występowania psychrotrofowych szczepów *Bacillus cereus* w mleku surowym, środowisku jego pozyskiwania i w wybranych produktach mleczarskich oraz określenie u wybranych szczepów zdolności do rozwoju w mleku przetrzymywanym w 4°, 6° i 8°C w ciągu 7 dni.

### **Materiał i metody**

Badania wykonano w dwóch etapach. W etapie I materiałem badawczym było 821 szczepów wyizolowanych z próbek: gleby (29 szczepów), kału krów (221), pasz (90), powierzchni strzyków (142), powierzchni kubków udojowych (38), mleka surowego (152), mleka spożywczego pasteryzowanego (33) oraz serów pleśniowych (116). Przed przystąpieniem do badań wszystkie szczepy poddano kilkukrotnym rysowym przesiewom na pożywkę według Mossela (MYP, Merck nr kat. 1.05463) w celu oczyszczenia szczepów. U wszystkich szczepów określono właściwości psychrotrofowe w następujący sposób: z 48-godzinnej hodowli na pożywkę stałej MYP sporządzano 2 cm<sup>3</sup> zawiesiny badanego szczepu *B. cereus* o mętności odpowiadającej wzorcowi 2 skali McFarlanda. Następnie na

<sup>\*)</sup> Badania wykonano w ramach grantu KBN 6 PO6G 03620.

podsuchoną w płytkach Petriego pożywkę PCSMA (Merck, nr kat. 1.15338) posiewano rysowo otrzymaną zawiesinę komórek. Płytki inkubowano w temperaturze 6,5°C przez 10 dni, a pojawienie się po tym czasie wzrostu świadczyło o zdolnościach psychrotrofowych określonego szczepu. Wszystkie płytki Petriego, na których nie było widocznego wzrostu pozostawiano na kolejne 24 godziny w temperaturze 30°C. Na wszystkich tych płytkach zaobserwowano wzrost *B. cereus*, co świadczyło o obecności żywych komórek badanych szczepów.

Do badań w etapie II przeznaczono tylko wybranych w sposób losowy 35 szczepów *B. cereus* pochodzących z mleka surowego i środowiska jego pozyskiwania (7 szczepów wyizolowanych z pasz, 7 – z kału krów, 6 – z powierzchni strzyków, 2 – z kubków udojowych oraz 12 – z mleka surowego). Szczepy przesiewano rysowo eżą na płytki Petriego z pożywką MYP, w celu ich namnożenia. Płytki inkubowano w temperaturze 30°C przez 24-48 godzin lub dłużej tak, aby hodowle zawierały co najmniej 50% przetrwalników. Po okresie inkubacji zmywano hodowlę *B. cereus* 10 cm<sup>3</sup> jałowego roztworu fizjologicznego i przenoszono do próbówki. Zawartość próbówki dokładnie mieszano i oznaczano metodą płytkową liczbę *B. cereus*, stosując pożywkę MYP. Wynik wyrażano jako liczbę j.t.k. w 1 cm<sup>3</sup> wyjściowej zawiesiny. Probówkę z zawiesiną do czasu uzyskania wyników przetrzymywano w wodzie z lodem w temperaturze około 2°C. Następnie do 3 kolb z 200 cm<sup>3</sup> jałowego mleka dodawano tyle zawiesiny, aby początkowa liczba komórek wynosiła około 10<sup>3</sup> j.t.k. w 1 cm<sup>3</sup> mleka. Zaszczepione mleko dokładnie mieszano i przetrzymywano jedną z kolb w temperaturze 4°C ± 0,5°C, drugą – w temperaturze 6°C ± 0,5°C, a trzecią kolbę w temperaturze 8°C ± 0,5°C przez 7 dni, po czym określano liczbę *B. cereus* metodą płytkową na pożywce według Mosse-la. W celu określenia początkowej liczby komórek w zaszczepionym mleku, pierwszą analizę wykonywano bezpośrednio po dodaniu odpowiednich rozcieńczeń zawiesiny do kolb z mlekiem.

### Wyniki i omówienie

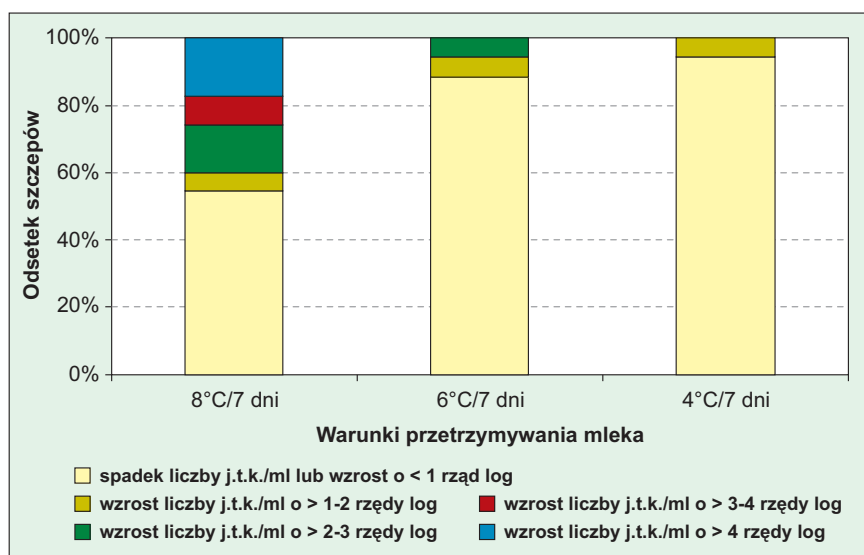
Cechy psychrotrofowe, czyli zdolność do wzrostu i tworzenia kolonii w temperaturze 6,5°C/10 dni, co badano w etapie I, stwierdzono u 78 szczepów, czyli u 9%. Zdolności psychrotrofowych nie wykazał żaden ze szczepów pochodzących z powierzchni strzyków, tylko jeden szczep wyizolowany z powierzchni kubków udojowych i 3% szczepów pochodzących z kału krów. Wśród szczepów pochodzących z pozostałych środowisk, które mogą stanowić pośrednie źródło *Bacillus cereus* w mleku surowym, czyli z gleby i pasz, 7% szczepów było zdolnych do tworzenia kolonii w czasie 10 dni w temperaturze 6,5°C. Interesujące jest, że większy odsetek szczepów wyizolowanych z mleka surowego i produktów mlecznych wykazywał właściwości psychrotrofowe (od 12% szczepów pochodzących z mleka spożywczego pasteryzowanego do 25% szczepów pochodzących z mleka surowego) niż szczepów pochodzących ze środowiska. Inaczej mówiąc, spośród szczepów, u których stwierdzo-

Tab. 1. Cechy psychrotrofowe szczepów *B. cereus* pochodzących z różnych źródeł

Pochodzenie szczepów	Liczba szczepów badanych	Liczba (%) szczepów psychrotrofowych
Gleba	29	2 (7)
Kał krów	221	7 (3)
Pasze	90	6 (7)
Powierzchnia strzyków	142	0
Powierzchnia kubków udojowych	38	1 (3)
Mleko surowe	152	38 (25)
Mleko spożywcze pasteryzowane	33	4 (12)
Sery pleśniowe	116	20 (17)
Razem	821	78 (9)

no cechy psychrotrofowe, aż 80% pochodziło z mleka surowego i produktów mlecznych.

Wyniki te odbiegają znacznie od podawanych w piśmiennictwie. W systematyce Bergeya (2) podano, że ponad 90% szczepów *B. cereus* nie rozwija się w temperaturze 5°C, a 11-89% rozwija się w temperaturze 10°C. Wśród szczepów *B. cereus* badanych przez Christianssona i wsp. (7), cechy psychrotrofowe wykazywało 57% szczepów wyizolowanych z odchodów krów, 67% – z siana, 97% – z trawy. Te Giffel i wsp. (23) stwierdzili właściwości psychrotrofowe u 66% szczepów pochodzących z gleby i odchodów krów, 63% – pochodzących z trawy, 55% szczepów wyizolowanych z powierzchni wymienia i 28% – z mleka surowego. Rozbieżność wyników uzyskanych przez cytowanych autorów i w badaniach niniejszych może być tłumaczona stosowaniem różnych metod określania cech psychrotrofowych. Dla przykładu warto podać, że Foegeding i Berry (9) przebadali 27 szczepów *B. cereus* pochodzących z żywności i wyizolowanych z przypadków zatruc od ludzi i zaobserwowali, że połowa szczepów była zdolna do tworzenia kolonii na płytkach Petriego podczas inkubacji w temperaturze 10°C przez 7 dni, ale tylko 2 szczepy tworzyły kolonie po inkubacji płytek w temperaturze 7°C przez 10 dni (parametry zbliżone do stosowanych w niniejszej pracy). Podali też, że 19 szczepów rosło w temperaturze 7°C w ciągu 10 dni po uprzedniej adaptacji szczepów w tej temperaturze przez 5 tygodni. Myllikangas (17), powołując się na badania holenderskie i własne podaje, że *B. cereus* nie rozwija się w temperaturze poniżej 6°C, jednakże większość badaczy potwierdziło występowanie w obrębie tego gatunku szczepów, które rosną w temperaturze 6°C i nawet niższej. Larsen i Jorgensen (15) obecność psychrotrofowych szczepów *B. cereus* stwierdzili w 25% badanych próbek mleka surowego. Wśród 154 szczepów wyizolowanych z mleka pasteryzowanego przez Van Nettekna i wsp. (18) 54% stanowiły szczepy psychrotrofowe, ale tylko 15% szczepów badanych przez Granuma i wsp. (10).



Ryc. 1. Odsetek szczepów *B. cereus* w zależności od zdolności do rozwoju w mleku przetrzymywanym w temperaturze 4°C, 6°C lub 8°C w ciągu 7 dni

Wyniki badań otrzymane w etapie II przedstawiono na ryc. 1. Dla potrzeb interpretacji wyników za przyrost liczby j.t.k. *Bacillus cereus* w 1 cm<sup>3</sup> mleka przyjęto wzrost liczby początkowej co najmniej o 1 rząd wielkości w czasie trwania eksperymentu.

Określenie możliwości wzrostu *B. cereus* w mleku przetrzymywanym w niskiej temperaturze jest zagadnieniem odmiennym niż określanie metodą klasyczną cech psychrotrofowych (6,5°C/10 dni), w której wymaga się takiego rozwoju, aby były widoczne kolonie. Rozwój ten jednak jest zapoczątkowany wcześniej zanim stanie się widoczny, a liczba komórek może zwiększyć się o kilka rzędów wielkości i zapoczątkować psucie się mleka. Jest to jednocześnie zagadnienie interesujące, ze względu na stosowanie w przemyśle mleczarskim niskiej temperatury podczas przetrzymywania mleka pasteryzowanego. Temperatura ta jest stale obniżana, ponieważ obserwuje się zjawisko przystosowywania się do niej drobnoustrojów. Z kolei wydłużany jest czas przechowywania produktu. W niniejszych badaniach zastosowano temperatury jak najbardziej zbliżone do tych, które w Polsce obowiązują w zakładach mleczarskich (nie wyższa niż 6°C) lub w handlu dla mleka pasteryzowanego (nie wyższa niż 8°C).

W mleku pasteryzowanym z reguły występują przetrwalniki *B. cereus*, ale w wyniku zanieczyszczeń po pasteryzacji mogą dostawać się również komórki wegetatywne, dlatego też zdecydowano się w niniejszych badaniach do mleka dodawać zawiesinę zawierającą zarówno przetrwalniki, jak i komórki wegetatywne. W przypadku, gdy są obecne przetrwalniki, ich przekształcenie w formy wegetatywne i rozwój zależy od zdolności kiełkowania w niskiej temperaturze.

Spośród badanych szczepów 17, czyli ponad połowa (51,4%), nie rozwijała się w mleku przetrzymywanym w temperaturze 4, 6, i 8°C przez 7 dni. Takie szczepy nie będą obniżać trwałości mleka pasteryzo-

wanego. Wśród szczepów pochodzących z mleka surowego odsetek szczepów nie rozwijających się w badanych warunkach wynosił 58%, natomiast wśród szczepów pochodzących ze środowiska pozyskiwania mleka odsetek ten był mniejszy i sięgał 47%. Pozostałe szczepy rozwijały się, chociaż z różną intensywnością, zależnie od temperatury.

W mleku przetrzymywanym w temperaturze 4°C zwiększenie liczby komórek zaobserwowano tylko u dwóch szczepów pochodzących z mleka surowego i kału krów. Wzrost liczby ich komórek sięgnął nieco powyżej 1 rzędu wielkości. Pozostałe szczepy w badanej temperaturze nie rozwijały się, a u nielicznych szczepów liczba komórek nawet obniżyła się. Trwałość mleka pasteryzowanego zawierającego takie szczepy *B. cereus* będzie u temperaturze 4°C sięgać co najmniej 7 dni.

W temperaturze 6°C zaobserwowano zwiększenie się liczby komórek czterech szczepów. Dwa z tych szczepów rozwijały się także w temperaturze 4°C, przy czym zwiększenie liczby w wyższej temperaturze przekraczało 2 rzędy wielkości. Wzrost liczby komórek pozostałych dwóch szczepów wyizolowanych także z mleka i kału sięgał ponad 1 rząd wielkości.

W mleku przetrzymywanym w temperaturze 8°C rozwijało się 16 szczepów (45,7%) pochodzących z paszy, kału krów, powierzchni strzyków i kubków udojowych oraz z mleka surowego. Liczba j.t.k. w 1 cm<sup>3</sup> mleka u 20% szczepów wzrosła o ponad 4 rzędy wielkości, u 5,7% – o 3-4 rzędy, u 14,3% – o 2-3 rzędy, a u 5,7% – o 1-2 rzędy.

Otrzymane wyniki trudno jest porównywać z danymi piśmiennictwa ze względu na brak publikacji dotyczących badań przeprowadzanych w podobny sposób, chociaż dużo jest badań, w których określano zdolność do rozwoju *B. cereus* w niskiej temperaturze. Ze wszystkich publikacji i niniejszych badań wynika, że znaczna część szczepów *B. cereus* może rozwijać się w niskiej temperaturze, stosowanej w warunkach przemysłowych przy przechowywaniu produktów mleczarskich i obniżać ich trwałość, a nawet wytwarzać enterotoksyny (4). Szczepy takie występują powszechnie w środowisku pozyskiwania mleka.

Zdaniem wielu badaczy (11, 14, 20, 21), liczba komórek *B. cereus* ok. 10<sup>3</sup> w 1 cm<sup>3</sup> mleka może stanowić zagrożenie dla zdrowia konsumenta. Griffiths i Phillips (13) zaobserwowali po 7 dniach inkubacji w temperaturze 6°C rozwój 2 badanych szczepów *B. cereus* pochodzących z mleka surowego i pasteryzowanego od początkowej liczby 10<sup>2</sup>-10<sup>3</sup> j.t.k. w 1 cm<sup>3</sup> do końcowej liczby 10<sup>7</sup>-10<sup>8</sup> j.t.k. w 1 cm<sup>3</sup>. Długość fazy spoczynkowej w tej temperaturze wynosiła 90 i 132 godziny, natomiast w temperaturze 10°C – tylko 22 i 25 godzin. W doświadczeniach Armesto i Su-

therlanda (1) zwiększenie liczby *B. cereus* o 2-4 rzędy wielkości nastąpiło podczas inkubacji szczepów w mleku w temperaturze 6,5°C w ciągu 10 dni.

Spośród szczepów badanych w niniejszej pracy 4 szczepy rozwijały się w temperaturze 6°C, a liczbę > 10<sup>3</sup> j.t.k./cm<sup>3</sup> mleka, którą uznaje się za graniczną ze względu na bezpieczeństwo zdrowotne produktów spożywczych stwierdzono dla 3 z nich. Temperatura 8°C nie jest odpowiednia dla zapewnienia trwałości mleka w ciągu 7 dni ze względu na możliwość intensywnego rozwoju znacznego odsetka szczepów (45,7%) do poziomu przekraczającego 10<sup>3</sup> j.t.k./cm<sup>3</sup> mleka. U 2 szczepów pochodzących z kału i mleka surowego liczba j.t.k. w mleku przechowywanym w temperaturze 8°C osiągnęła po 7 dniach wartość 1,1 × 10<sup>7</sup> i 4,4 × 10<sup>8</sup> w 1 cm<sup>3</sup> i zwiększyła się o ponad 5 rzędów wielkości.

Jak podali Nothermans i wsp. (19), podczas przetrzymywania mleka pasteryzowanego w temperaturze 8°C, *B. cereus* powodował jego zepsucie po 12 dniach, a liczba komórek *B. cereus* przekraczała 10<sup>5</sup> j.t.k./cm<sup>3</sup>. W temperaturze 10°C zepsucie mleka następowało już po 8 dniach przetrzymywania. Te Giffel i wsp. (22) stwierdzili, że po 7 dniach przetrzymywania pasteryzowanego mleka w temperaturze 7°C liczba *B. cereus* wynosiła 10<sup>5</sup> j.t.k./cm<sup>3</sup>. Väisänen i wsp. (24) i Te Giffel i wsp. (22) wyrazili interesujący pogląd, że podczas chłodniczego przechowywania mleka zachodzi nie tylko rozwój szczepów wykazujących tolerancję na niską temperaturę, ale także selekcja i przystosowywanie się wciąż nowych szczepów do tych warunków, a więc nabywanie nowych cech genetycznych.

### Wnioski

1. W mleku surowym i środowisku jego pozyskiwania, a także w mleku spożywczym pasteryzowanym i serach pleśniowych występują szczepy *Bacillus cereus* o właściwościach psychrotrofowych.

2. Najwyższa dopuszczalna w Polsce temperatura przechowywania mleka spożywczego pasteryzowanego w handlu (8°C) i transporcie (6°C) nie jest temperaturą wystarczającą do zagwarantowania bezpieczeństwa zdrowotnego produktu ze względu na możliwość rozwoju psychrotrofowych szczepów *B. cereus*.

3. W mleku surowym i środowisku jego pozyskiwania występują szczepy *B. cereus* zdolne do rozwoju w mleku w temperaturze 4°C w ciągu 7 dni.

### Piśmiennictwo

1. Armesto R. G., Sutherland A. D.: Temperature characterization of psychrotrophic and mesophilic *Bacillus* species from milk. *J. Dairy Res.* 1997, 64, 261-270.
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., Gibowicz H.: Występowanie *Bacillus cereus* w rynkowych produktach mleczarskich. *Przegl. Mlecz.* 2005, 12, 4-6.
4. Berthold A., Molska I.: Production of diarrheal enterotoxin and psychrotrophic properties of *Bacillus cereus* strains isolated from various sources. *Polish J. Nat. Sci.* 2002, 11, 109-114.
5. Berthold A., Molska I.: Występowanie *Bacillus cereus* w mleku surowym. *Żywność Nauka Technologia Jakość* 2002, 32, Supl., 8-17.

6. Berthold A., Molska I.: Występowanie *Bacillus cereus* w środowisku pozyskiwania mleka. *Medycyna Wet.* 2004, 60, 42-45.
7. Christiansson A., Bertlissson J., Svensson B.: *Bacillus cereus* spores in raw milk: factors affecting the contamination of milk during the grazing period. *J. Dairy Sci.* 1999, 82, 305-313.
8. Fermentan C., Fremy J. M., Claisse M.: Effect of temperature on the vegetative growth of type and field strains of *Bacillus cereus*. *Lett. Appl. Microbiol.* 1994, 19, 414-418.
9. Foegeding P. M., Berry E. D.: Cold temperature growth of clinical and food isolates of *Bacillus cereus*. *J. Food Prot.* 1997, 60, 1256-1258.
10. Granum P. E., Brynestad S., Kramer J. M.: Analysis of enterotoxin production by *Bacillus cereus* from dairy products, food poisoning incidents and non-gastrointestinal infections. *Int. J. Food Microbiol.* 1993, 17, 269-279.
11. Granum P. E., Lund T.: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol. Lett.* 1997, 157, 223-228.
12. Griffiths M. W.: *Bacillus cereus* in liquid milk and other milk products. *Bull. IDF* 1992, 275, 36-39.
13. Griffiths M. W., Phillips J. D.: Incidence, source and some properties of psychrotrophic *Bacillus* spp. found in raw and pasteurized milk. *J. Soc. Dairy Technol.* 1990, 43, 62-66.
14. Kramer J. M., Gilbert R. J.: *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species, [w:] *Foodborne Bacterial Pathogens*. Doyle M. P. (red.): Marcel Dekker Inc., New York, 1989, 21-70.
15. Larsen H. D., Jorgensen K.: The growth of *Bacillus cereus* in pasteurized milk products. *Int. J. Food Microbiol.* 1999, 46, 173-176.
16. Meer R. R., Baker J., Bodyfelt F. W., Griffiths M. W.: Psychrotrophic *Bacillus* spp. In fluid milk products: A review. *J. Food Prot.* 1991, 54, 969-979.
17. Myllikangas O.: Studies on the temperatures of Finnish milk and milk products at the different stages of milk treatment and their influence on the growth of *Bacillus cereus* in milk in particular. *Praca doktorska, University of Veterinary Medicine, Helsinki* 1995.
18. Netten Van P., Van De Moosolijk A., Van Hoensel P., Mossel D. A. A., Perales I.: Psychrotrophic strains of *Bacillus cereus* producing enterotoxin. *J. Appl. Bacteriol.* 1990, 69, 73-79.
19. Nothermans S., Dufrenne J., Teunis P., Beumer R. R., Te Giffel M. C., Weem P. P.: A risk assessment study of *Bacillus cereus* present in pasteurized milk. *Food Microbiol.* 1997, 14, 143-151.
20. Shinagava K.: Serology and characterization of toxigenic *Bacillus cereus*. *Neth. Milk Dairy J.* 1993, 47, 89-103.
21. Sutherland A. D.: Toxin production by *Bacillus cereus* in dairy products. *J. Dairy Res.* 1993, 60, 569-574.
22. 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.
23. 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.
24. Väisänen O. M., Mwaisumo N. J., Salkinoja-Salonen M. S.: Differentiation of dairy strains of the *Bacillus cereus* group by phage typing, minimum growth temperature and fatty acid analysis. *J. Appl. Bacteriol.* 1991, 70, 315-324.

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