

Mleko i produkty mleczne jako nośnik potencjalnie toksynotwórczych *Bacillus* spp.

ELŻBIETA DACZKOWSKA-KOZON, ALICJA DŁUBAŁA,
AGNIESZKA BEDNARCZYK-DRAĞ

Katedra Mikrobiologii i Biotechnologii Stosowanej, Wydział Nauk o Żywności i Rybactwa,
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie, ul. Papieża Pawła VI 3, 71-459 Szczecin

Otrzymano 09.08.2013

Zaakceptowano 14.11.2013

Daczkowska-Kozon E., Dłubała A., Bednarczyk-Drağ A.

Milk and milk products as carriers of potentially toxinogenic *Bacillus* spp.

Summary

The diversity of processed milk and milk based products requiring cold storage and their growing production scale may pose an increasing risk to consumers of this commodity group from the toxinogenic *Bacillus* spp., including species ignored so far in routine, potentially pathogenic *B. cereus* oriented food analysis. The prevalence of potentially toxinogenic *Bacillus* spp. in milk and milk-based products with a high share of strains psychrotrophic in nature does not guarantee the safety of such products under cold storage at $\geq 6^{\circ}\text{C}$ at retail.

With their infrequent presence in milk and no ability of potentially emetic strains to produce cereulide at $< 12^{\circ}\text{C}$ and also high incidence of strains carrying genes necessary to produce NHE, HBL enterotoxins, it seems obvious that the potentially enterotoxic, psychrotrophic *Bacillus* spp. may pose a major threat to consumers of milk and milk based products. Contaminating milk mostly as spores, with their 100% survival rate of the stomach passage, regardless of the stomach pH, it may cause food borne diseases at a contamination level of milk and milk-based products much lower than generally acknowledged.

The actual higher number of food borne cases caused by *Bacillus* spp. compared to those recognized in statistics call for the elaboration of more efficient identification methods of pathogenic *Bacillus* spp. in food and, furthermore, for the verification of existing criteria addressed to these pathogens in products of extended shelf-life under cold storage, such as milk and milk-based products.

Keywords: milk, milk products, toxinogenicity, *Bacillus* spp., *B. cereus*

Skład chemiczny mleka, w tym obecność wysoko-wartościowych białek, lekkostrawnych tłuszczów, ważnych makroelementów – Ca, P, witamin (A, D, E, K i B), mikroelementów, takich jak np.: Fe, Mo, Se czy Zn, sprawia, że jest ono ważnym składnikiem diety człowieka (4), a jednocześnie doskonałą pożywką dla mikroorganizmów. Przy różnych możliwych źródłach i drogach zanieczyszczenia mikrobiologicznego mleka w jego skład wchodzić mogą także bakterie chorobotwórcze, w tym toksynotwórcze *Bacillus* spp., trafiające do mleka surowego głównie w postaci spor (28).

Dostępne w ofercie handlowej mleko spożywcze to głównie nie wymagające przechowywania chłodniczego mleko UHT (Ultra High Temperature) i, wymagające takiego zabezpieczenia, mleko pasteryzowane HTST (High Temperature Short Time), LTLT (Low Temperature Long Time), w tym mleko produkowane w technologii ESL (Extended Shelf Life); to ostatnie o przydatności do spożycia w warunkach przechowywania chłodniczego wydłużonej do 21 dni (32).

Nazbyt wolne schładzanie większych partii pasteryzowanego mleka czy niewłaściwa temperatura przechowywania sprzyjać mogą przechodzeniu pobudzonych do kiełkowania spor *Bacillus* spp. w formy wegetatywne i namnażaniu się ich w produkcie. Zależnie od szczepu skutkować to może zmianą parametrów organoleptycznych produktu lub objawami infekcji/zatrucia pokarmowego u jego konsumentów. W przypadku mleka i przetworów mlecznych, wymagających ciągłości łańcucha chłodniczego od producenta do konsumenta, istotny problem stanowią mogą psychrotrofowe toksynotwórcze *Bacillus* spp. (5, 14).

Ocenia się, że w USA około 25% problemów jakościowych dotyczących przechowywanych chłodniczo ($\leq 4^{\circ}\text{C}$) pasteryzowanych produktów mlecznych może być związanych z tą grupą bakterii. Przy temperaturze dla transportu i przechowywania mleka/produktów mlecznych w obrocie w UE, w tym w Polsce, określonej na $\leq 6-10^{\circ}\text{C}$ i $\leq 6^{\circ}\text{C}$ (30, 31), obecność potencjalnie toksynotwórczych psychrotrofowych *Bacillus*

spp. oznaczać może realne zagrożenie dla ich jakości i bezpieczeństwa zdrowotnego.

Wg Schmidt i wsp. (34), wyprodukowane w Niemczech, Austrii i Szwajcarii mleko ESL, przechowywane w temperaturze 8°C i poddane analizie na granicy przydatności do spożycia, nie spełniało kryteriów jakościowych w 8% przebadanych prób, zaś obecność potencjalnie toksynotwórczych bakterii, w tym *B. cereus*, *B. weihenstephanensis*, *B. pumilus* potwierdzono w 12,1% jednostkowych opakowań handlowych.

Potencjał toksynotwórczy *Bacillus* spp.

Spośród blisko 270 zidentyfikowanych dotąd gatunków rodzaju *Bacillus* (11) z przypadków infekcji/zatruc pokarmowych izolowano szczepy zaliczane do grupy *B. cereus*, w tym głównie *B. cereus sensu stricto* i *B. cytotoxicus* sp. nov.1 (17). Sporadycznie jako czynnik etiologiczny infekcji/zatruc pokarmowych wskazywano także inne gatunki *Bacillus*, tj.: *B. licheniformis*, *B. lentus*, *B. pumilus*, *B. sphaericus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* czy *B. circulans* (1, 5, 22, 33).

Za biegunkowy typ zatrucia pokarmowego odpowiadają szczepy zdolne do produkcji termolabilnych, białkowych enterotoksyn, takich jak: hemolizyna BL (HBL), enterotoksyna niehemolityczna NHE czy cytotoksyna K (CytK). Toksyny HBL i NHE składają się z 3 komponentów białkowych każda. HBL tworzą 2 białka lityczne L2 i L1 oraz białko wiążące B kodowane, odpowiednio, przez geny hblC, hblD i hblA (15). Toksynę NHE tworzą białka NheA, NheB i NheC, kodowane przez geny nheA, nheB i nheC (36). Występująca w dwóch odmianach – bardziej – CytK-1 i mniej toksycznej CytK-2 cytotoksyna K jest pojedynczym białkiem o masie 34 kDa (12, 23). Wg Guinebreiere i wsp. (17), szczepy wytwarzające CytK-1 stanowią nowy, wydzielony z *B. cereus sensu stricto*, gatunek *B. cytotoxicus*. Enterotoksyny, produkowane i uwalniane w jelicie cienkim konsumenta, w zależności od liczebności komórek szczepu – producenta i wrażliwości osobniczej, wywołują biegunkę po 8-16 h od spożycia produktu (16).

Wymiotny typ zatrucia pokarmowego jest wynikiem obecności w żywności ciepłostajnej toksyny – cereulidyny. Cereulidyna, produkowana przez nieliczne szczepy *B. cereus sensu stricto* i *B. weihenstephanensis*, jest cyklicznym dodekadepsiptydem o masie 1,2 kDa. Stabilna w temperaturze 121°C przez 90 min. i w pH 2-11, ta termo- i kwasoodporna toksyna nie ulega rozkładowi pod wpływem enzymów trawiennych: pepsyny i trypsyny (5, 9).

Zależnie od warunków środowiskowych emetyczny szczep *B. cereus sensu stricto* produkować może 0,03-13,3 µg cereulidyny/g/mL produktu (10). Według Finlay i wsp. (14), produkcja cereulidyny jest większa w mleku odtłuszczonego o temperaturze 12-15°C niż w przetrzymywanym w wyższych temperaturach mleku pełnym. Uwalniana do środowiska w logarymicz-

nej fazie wzrostu, wprowadzona do organizmu w ilości 0,02-1,83 µg/kg masy ciała, w zależności od nośnika i wrażliwości osobniczej konsumenta, wywołuje wymioty po 1-5 h (5, 19).

Potencjalnym zagrożeniem dla zdrowia konsumentów mogą być także szczepy gatunków zaliczanych do grupy *B. subtilis*, takich jak np.: *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. mojavensis* czy *B. subtilis*, zdolne do produkcji cytotoksycznych cyklicznych lipopeptydów, w tym np.: termostabilnej lichenizyny A, pumilacydyny, surfaktyny (22, 26, 33) czy amylozyny (1). Zatrucia/infekcje pokarmowe na tle innych niż *B. cereus* gatunków łączone z nośnikiem takim jak mleko spożywcze i jego przetwory notowano dotąd jedynie sporadycznie. Przykładem zagrożeń, jakich mogą być źródłem, może być jednak opisany przez Salkinoja-Salonen i wsp. (33), przypadek zgonu z powodu zatrucia po spożyciu mleka w proszku zanieczyszczonego *B. licheniformis*.

Potencjalnie toksynotwórcze *Bacillus* spp. w mleku i produktach mlecznych

Powszechnie obecne w środowisku naturalnym *Bacillus* spp. trafiać mogą do mleka różnymi drogami, a wśród możliwych źródeł zanieczyszczenia wymienia się: wymię, glebę, materiał ściółkowy, kiszonki, paszę, powietrze, sprzęt do udoju, powierzchnie i sprzęt roboczy czy bioaerozol (5, 6, 13, 24).

Przy znacznym rozrzucie w częstości występowania *Bacillus* spp./*B. cereus* w mleku oscylującym, w zależności od kraju badań, w przedziale < 1-67% (2, 8, 15, 21), poziom zanieczyszczenia zwykle nie przekracza 10³ jtk mL⁻¹ (2, 15, 18). Częstsza obecność potencjalnie toksynotwórczych *B. cereus* w mleku pasteryzowanym niż surowym wskazywać może na proces produkcji jako źródło wtórnego zanieczyszczenia mleka lub na możliwość popasteryzacyjnego namnażania się, powstałych ze spor, form wegetatywnych. Warto podkreślić, że przy podobnej częstości występowania poziom zanieczyszczenia mleka spożywczego *Bacillus* spp. w Polsce, wynoszący zwykle ≤ 10² jtk mL⁻¹ (2, badania własne), jest niższy niż np. w Holandii (15) czy Danii (21) gdzie sięga, odpowiednio, ≤ 10³ i ≤ 10⁵ jtk mL⁻¹.

Przy podobnej do mleka skali i stopniu zanieczyszczenia *B. cereus* większości produktów mlecznych, uwagę zwraca widocznie częstsza obecność *B. cereus* w lodach (7, 18, 25, 38), w tym szczepów potencjalnie toksynotwórczych. W Bawarii np. aż 4,7% (24/508) *B. cereus*-dodatnich partii lodów było nośnikiem szczepów o potencjale wymiotnym (25).

Produkty mleczne powiązane też z potwierdzonymi przypadkami zatruc pokarmowych na tle innych *Bacillus* spp. W Finlandii (33) np. toksynotwórcze *B. licheniformis* były przyczyną 2 potwierdzonych przypadków zatruc pokarmowych po spożyciu lodów. W 111 innych przypadkach, w których nośnikiem *Bacillus* spp., w tym *B. licheniformis*, był pudding

waniliowy, 6 osób wymagało hospitalizacji, w tym 1 przypadek zakończył się zgonem pacjenta (33).

Potencjalnie toksynotwórcze psychrotrofowe *Bacillus* spp. w mleku

Poza częstotścią występowania i liczebnością w produkcji, o stopniu zagrożenia dla zdrowia konsumenta ze strony potencjalnie chorobotwórczych *Bacillus* spp. decydują możliwości wzrostowe i toksynotwórcze szczepu w określonych warunkach przechowywania mleka i jego przetworów. Psychrotrofowość, tj. zdolność do wzrostu w warunkach przechowywania chłodniczego, w grupie „toksynotwórczych” *Bacillus* spp. przypisywana głównie gatunkom *B. weihenstephanensis* i *B. mycoides*, potwierdzana jest coraz częściej także u innych przedstawicieli grupy *B. cereus*, jak też innych *Bacillus* spp. (2, 5, 26, 28, 35).

Wg Berthold (3), spośród wyizolowanych z mleka szczepów *B. cereus*, wzrost w temperaturze 6,5°C w ciągu 10 dni inkubacji dawało 12-25% szczepów. W grupie szczepów *B. cereus* wyizolowanych z mleka surowego i pasteryzowanego wszystkie wyrastały w temperaturze 12°C do 10 dni, zaś w 8°C zdolność taką posiadało, odpowiednio, 8% i 58% z nich. Powodem do niepokoju może być wyższy udział psychrotrofowych *Bacillus* spp. w zanieczyszczeniu mleka pasteryzowanego w porównaniu z surowym oraz możliwość namnażania się szczepów z tej grupy do poziomu $> 10^5$ jtk/mL w temperaturach chłodniczych (6-10°C), w czasie krótszym niż deklarowany okres przydatności produktu do spożycia.

Przy częstej obecności szczepów będących nośnikami genów warunkujących produkcję składowych określonych enterotoksyn, zdolność do produkcji toksyny wymiotnej w mleku potwierdzana jest zwykle u niewielkiego procenta szczepów (2, 35). Na 8239 szczepów *B. cereus* wyizolowanych ze środowiska pozyskiwania i przetwarzania mleka w Szwecji zdolność do produkcji cereulidyny potwierdzono jedynie u $< 1,0$ -3,8% (miejsce pozyskiwania) i 0,05% (środowisko przetwórcze) szczepów (35). W grupie 272 szczepów wyizolowanych z surowego mleka przez Bartoszewicz i wsp. (2) tylko jeden, zaklasyfikowany jako *B. cereus sensu stricto*/*B. weihenstephanensis*, określono jako potencjalnie wymiotny. W badaniach własnych żaden z 73 szczepów *B. cereus sensu stricto*, wyizolowanych z surowego mleka od różnych dostawców z regionu Pomorza Zachodniego nie był nośnikiem genu *ces*.

Analiza potencjału enterotoksycznego wyizolowanych z mleka szczepów zidentyfikowanych jako *B. cereus sensu stricto*/*B. weihenstephanensis*, *B. thuringiensis* i *B. mycoides*/*B. pseudomycoides* wykazała obecność genów *hblA*, *nheA* i *cytK* u, odpowiednio, 78, 54 i 57% szczepów *B. cereus s.s.*/*B. weihenstephanensis*, 85, 55 i 60% szczepów *B. thuringiensis* oraz 30, 70 i 0% szczepów *B. mycoides*/*B. pseudomycoides* (2). Przyjmując, że warunkiem enterotoksyczności jest

posiadanie przez szczep kompletu genów warunkujących produkcję wszystkich 3 składowych toksyn NHE i HBL, obraz potencjału enterotoksycznego szczepów mógłby się istotnie różnić. W badaniach własnych przy udziale psychrotrofowych *B. cereus s.s.* określonym, w mleku surowym, na 54,8% (40/73) nośnikiem genów *hblA*, *nheA* i *cytK* było, odpowiednio, 62,5; 77,5 i 10% z nich. Jednocześnie komplet genów warunkujących produkcję wszystkich 3 składowych toksyn HBL i NHE posiadało, odpowiednio, 15 i 20% psychrotrofowych *B. cereus s.s.* W grupie 40 psychrotrofowych *B. cereus s.s.* tylko 1 szczep był nośnikiem wszystkich oznaczanych genów enterotoksyn (badania własne).

***Bacillus* spp. w statystykach epidemiologicznych zatruc pokarmowych**

Zawarte w statystykach epidemiologicznych dane dotyczące przypadków zachorowań na tle *B. cereus*/*Bacillus* spp. sugerują, że stanowią one jedynie niewielki procent odnotowywanych przypadków zatruc pokarmowych. Nie ulega jednak wątpliwości, że w większości potwierdzonych przypadków zatruc pokarmowych na tle *B. cereus*/*Bacillus* spp. nośnikiem bakterii były produkty poddane obróbce termicznej, wymagające w trakcie przechowywania i obrotu zabezpieczenia chłodniczego.

Wg EFSA (10), w 2010 r. toksynotwórcze *Bacillus* odpowiadały jedynie za 1,88% odnotowanych ognisk zatruc pokarmowych w UE, podczas gdy w 2011 r. były już czynnikiem sprawczym 3,9% ogółu odnotowanych ognisk. Jednocześnie w 2011 r. we Francji, na ogółem odnotowanych 197 ognisk infekcji/zatruc pokarmowych, w tym 60 o zidentyfikowanym czynniku sprawczym, *B. cereus* wskazano jako przyczynę w 56% z nich (5). Przy widocznej przewadze liczebnej odnotowanych ognisk/przypadków o nieznanym etiologii oraz znacznej, jak się powszechnie sądzi, liczbie nie zgłaszanych przypadków, częstość infekcji/zatruc pokarmowych na tle *Bacillus* spp. może być znacznie większa – wg CDC (Center for Disease Control, 2010), nawet 38-krotnie wyższa od tej odnotowywanej w statystykach.

Zdaniem epidemiologów, statystyki dotyczące przypadków infekcji/zatruc pokarmowych na określonym tle w skali roku zawierają jedynie przybliżone dane na temat ich liczby, a w przypadku takich patogenów, jak m.in. toksynotwórcze *Bacillus* spp. są mocno zaniżone (CDC 2010). Przyczyn takiego stanu rzeczy upatruje się m.in. w łagodnym, nie wymagającym interwencji medycznej przebiegu większości infekcji na tym tle, przypisaniu ich innemu niż faktycznie za nie odpowiedzialnemu czynnikowi sprawczemu obecnemu w produkcie-nośniku (5) czy, w przypadku atypowych emetycznych *B. cereus*, pomijanych w rutynowej analizie żywności (33), umieszczenie ich w grupie przypadków o nieznanym etiologii.

Na podstawie dostępnych danych epidemiologicznych można wnosić, że w niektórych krajach UE,

B. cereus znajduje się w czołówce list rankingowych przyczyn ogniskowych zatruć pokarmowych z potwierdzonym czynnikiem sprawczym. W Holandii np. w 2006 r. odpowiadał za 5,4% ogólnej liczby ognisk zatruć pokarmowych z potwierdzonym czynnikiem sprawczym, a od 1991 r. do 2006 r. zajmował pierwsze miejsce na tej liście (36). W krajach takich, jak Finlandia, Francja, Niemcy czy Norwegia w rankingu czynników sprawczych w 2000 r. przy udziale w ogólnej liczbie ognisk zatruć pokarmowych z potwierdzonym tłem określonym na 1,4%; 5,08%; 2,2% i 32%, *B. cereus* zajmował trzecie oraz pierwsze miejsce.

Dane epidemiologiczne dotyczące przypadków zatruć pokarmowych na tle *B. cereus* dowodzą, że warunkiem wystąpienia objawów jest osiągnięcie przez szczep liczebności przekraczającej 10^5 w 1 g/mL produktu (9). Zależy to także od produktu-nośnika i wrażliwości osobniczej konsumenta. Przykładowo, wypicie 250-450 mL przechowywanego chłodniczo pasteryzowanego mleka zawierającego 10^6 - 10^8 *B. cereus* w mL przez 34 zdrowych ochotników w wieku 20-60 lat wywołało jedynie łagodne, nietypowe dla *B. cereus*, objawy u 18 z nich (20). W innym przypadku puree warzywne zawierające $3,2 \times 10^5$ *B. cereus* NVH 391/98 (aktualnie *B. cytotoxicus*) w 1 g, podane 44 pensjonariuszom domu opieki we Francji wywołało objawy infekcji pokarmowej u wszystkich i zakończyło się zgonem 3 z nich (33).

Brak wpływu 1-godzinne go przebywania spor w środowisku soków żołądkowych o pH 2,0 oraz przeżywalność form wegetatywnych *B. cereus* przy przechodzeniu przez żołądek określona w badaniach modelowych (36) na 3-26% sugerują możliwość zatruć pokarmowych na tle enterotoksycznych *B. cereus* przy znacznie niższym poziomie zanieczyszczenia nimi produktów, w tym mleka i pochodnych.

Obowiązujące rozporządzenia lub wytyczne dotyczące oceny jakości mikrobiologicznej żywności uwzględniają analizę w kierunku *B. cereus* lub *Bacillus* spp. tylko w określonego typu produktach (9). W przypadku mleka i produktów mlecznych wymóg oznaczania przypuszczalnych *B. cereus* dotyczy jedynie „Preparatów w proszku do początkowego żywienia niemowląt i żywności dietetycznej w proszku specjalnego przeznaczenia medycznego przeznaczonej dla niemowląt w wieku do 6 m-cy”, stanowiąc jeden z wyróżników jakościowych higieny procesu produkcji (29).

Podsumowanie

Rosnąca skala produkcji mleka i różnorodność produktów mlecznych wymagających zabezpieczenia chłodniczego sprzyja wzrostowi zagrożenia w tej grupie towarowej ze strony toksynotwórczych *Bacillus* spp., w tym gatunków pomijanych w ukierunkowanej na potencjalnie chorobotwórcze *B. cereus* rutynowej analizie żywności. Częstość występowania potencjalnie toksynotwórczych *Bacillus* spp. w mleku i produk-

tach mlecznych i znaczny udział w tej grupie szczepów psychrotrofowych sprawiają, że temperatura $\leq 6^\circ\text{C}$ w obrocie nie gwarantuje bezpieczeństwa zdrowotnego takich produktów.

Przy znikomym zanieczyszczeniu mleka szczepami emetycznymi zdolnymi do produkcji cereulidyny w temp. $< 12^\circ\text{C}$ oraz znaczącym udziale szczepów posiadających geny warunkujące produkcję enterotoksyn NHE i HBL, główne zagrożenie dla zdrowia konsumenta mleka i produktów mlecznych stanowiąc będą potencjalnie enterotoksyczne, psychrotrofowe *Bacillus* spp. Obecne w mleku głównie w postaci spor, przy 100% ich przeżywalności przy przechodzeniu przez żołądek bez względu na jego pH, mogą być przyczyną zatruć pokarmowych przy poziomie zanieczyszczenia nimi produktów znacznie niższym niż się powszechnie sądzi.

Większa od ujmowanej w statystykach, faktyczna liczba ognisk/przypadków zatruć pokarmowych na tle *Bacillus* spp. oznacza potrzebę opracowania skuteczniejszych metod identyfikacji chorobotwórczych *Bacillus* spp. w żywności, a dalej weryfikacji kryteriów mikrobiologicznych dotyczących tych patogenów w produktach o wydłużonej trwałości, takich jak mleko spożywcze i jego przetwory.

Piśmiennictwo

1. Apetrotiaie-Constantin C., Mikkola R., Andersson M. A., Teplova V., Suominen I., Johanssonand T., Salkinoja-Salonen M.: *Bacillus subtilis* and *B. mojavensis* strains connected to food poisoning produce the heat stable toxin amylosin. J. Appl. Microbiol. 2009, 106 (6), 1364-5072.
2. Bartoszewicz M., Hansen B. M., Świecicka I.: The members of the *Bacillus cereus* group are commonly present contaminants of fresh and heat-treated milk. Food Microbiol. 2008, 25, 588-596.
3. Berthold A., Dolińska M.: Development of enterotoxigenic *Bacillus cereus* in milk products stored at different temperature. Materiały 1st Workshop on Microbiology in Health and Environmental Protection. MICROBIOT 2008. Łódź 2008.
4. Borowy T., Kubiak M. S.: Walory odżywcze mleka i przetworów mlecznych. Przegl. Mleczarski 2012, 9, 14-16.
5. Ceuppens S., Boon N., Uyttendaele M.: Diversity of *Bacillus cereus* group strains is reflected in their broad range of pathogenicity and diverse ecological lifestyles. FEMS Microbiol Ecol. 2013, 84, 433-450.
6. Christiansson A., Bertilsson J., Svensson B.: *Bacillus cereus* spores in raw milk: factors affecting the contamination of milk during the grazing period. J. Dairy Sci. 2012, 82, 305-314.
7. Citak S., Gundogan N., Alas Z. T.: Incidence and antimicrobial resistance of *Bacillus cereus* isolated from Turkish white cheese and ice-cream samples. Milchwissenschaft 2010, 65 (1), 52-55.
8. 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.
9. EFSA: *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. in foodstuffs. EFSA J. 2005, 175, 1-48.
10. EFSA: The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2011. EFSA J. 2013, 11 (4), 3129.
11. Ezzeby J. P.: List of prokaryotic names with standing in nomenclature. 2012.
12. Fagerlund A., Ween O., Lund T., Hardy S. P., Granum P. E.: Genetic and functional analysis of the cytK family genes in *Bacillus cereus*. Microbiol. 2004, 150, 2689-2697.
13. Faille C., Fontaine F., Bènézech T.: Potential occurrence of adhering living *Bacillus* spores in milk product processing lines. J. Appl. Microbiol. 2001, 90, 892-900.
14. Finlay W. J. J., Logan N. A., Sutherland A. D.: *Bacillus cereus* produces most emetic toxin at lower temperatures. Letters in Applied Microbiology 2002, 31, 385-389.

15. Giffel M. C., Beumer R. R., Granum P. E., Rombouts F. M.: Isolation and characterization of *Bacillus cereus* from pasteurised milk in household refrigerators in The Netherlands. *Int. J. Food Microbiol.* 1997, 34, 307-318.
16. Granum P. E., Lund T.: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins, *FEMS Microbiol. Lett.* 1997, 157, 223-228.
17. Guinebretière M. H., Auger S., Galleron N., Contzen M., Sarrau B., Buyser M. L., Lamberet G., Fagerlund A., Granum P. E., Lereclus D., Nguyen Ch., Sorokin A.: *Bacillus cytotoxicus* sp. nov. is a new thermotolerant species of the *Bacillus cereus* group occasionally associated with food poisoning. *IJSEM* 2013, 63, 31-40.
18. Hassan G. M., Ashmawy M. A. M., Meshref A. M. S.: Studies on enterotoxigenic *Bacillus cereus* in raw milk and some dairy products. *J. Food Safety* 2010, 30 (3), 569-583.
19. Häggblom M., Apetroaie M., Andersson C., Salkinoja-Salonen M. A.: Quantitative Analysis of Cereulide, the Emetic Toxin of *Bacillus cereus*, Produced under Various Conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002, 68, 2479-2483.
20. Langeveld L. P. M., Spronsen W. A. van, Vanberesteijn E. C. H., Notermans S. H. W.: Consumption by healthy adults of pasteurized milk with a high concentration of *Bacillus cereus*: a double-blind study. *J. Food Prot.* 1996, 59, 723-726.
21. Larsen H. D., Jørgensen K.: The occurrence of *Bacillus cereus* in Danish pasteurized milk. *Int. J. Food Microbiol.* 1997, 34, 179-186.
22. Logan N. A.: *Bacillus* and relatives in foodborne illness. *J. Appl. Microbiol.* 2011, 112, 417-429.
23. Lund T., Buyser M. L., de Granum P. E.: A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. *Mol. Microbiol.* 2000, 38, 254-261.
24. Magnusson M., Christiansson A., Svensson B.: *Bacillus cereus* spores during housing of dairy cows: factors affecting contamination of raw milk. *J. Dairy Sci.* 2007, 90, 2745-2754.
25. Messelhäusser U., Kämpf P., Fricker M., Ehling-Schulz M., Zucker R., Wagner B., Busch U., Höller C.: Prevalence of emetic *Bacillus cereus* in different ice creams in Bavaria. *J. Food. Prot.* 2010, 73 (2), 395-399.
26. Nieminen T., Rintaluoma N., Andersson M., Taimisto A. M., Ali-Vehmas T., Seppälä A., Priha O., Salkinoja-Salonen M.: Toxinogenic *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* from mastitic milk. *Vet. Microbiol.* 2007, 6, 124 (3-4), 329-339.
27. PN-EN-ISO 7932.: Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda oznaczania przypuszczalnych *Bacillus cereus*. Metoda liczenia kolonii w temperaturze 30°C, 2005.
28. Postollec F., Mathot A. G., Bernard M., Divanac'h M. L., Pavan S., Sohier D.: Tracking spore-forming bacteria in food: from natural biodiversity to selection by processes. *Int. J. Food Microbiol.* 2012, 158, 1-8.
29. Rozporządzenie Komisji Wspólnot Europejskich (WE) Nr 1441/2007, z dnia 5 grudnia 2007, zmieniające rozporządzenie (WE) nr 2073/2005 w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych. *Dz. U. L* 322/12.
30. Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 2 stycznia 2007, w sprawie wymagań weterynaryjnych przy produkcji produktów pochodzenia zwierzęcego przeznaczonych do sprzedaży bezpośredniej. *Dz. U.* 2007 Nr 5 poz. 38.
31. Rozporządzenie (WE) nr 853/2004 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 29 kwietnia 2004 roku ustanawiające szczegółowe przepisy dotyczące higieny w odniesieniu do żywności pochodzenia zwierzęcego. *Dz. U. L* 139/55.
32. Salacki K.: Mleko spożywcze. *Przegl. Mleczarski* 2011, 8, 50-52.
33. Salkinoja-Salonen M. S., Vuorio R., Andersson M. A., Kamfer P., Andersson M. C., Honkanen-Buzalski T., Scoging A. C.: Toxigenic strains of *Bacillus licheniformis* related to food poisoning. *Appl. Env. Microbiol.* 1999, 65, 4637-4645.
34. Schmidt V. S. J., Kaufmann V., Kulozik U., Scherer S.: Microbial biodiversity, quality and shelf life of microfiltered and pasteurized extended shelf life (ESL) milk from Germany, Austria and Switzerland. *Int. J. Food Microbiol.* 2012, 154, 1-9.
35. Svensson B., Monthan A., Guinebretière M.-H., Nguyen-The Ch., Christiansson A.: Toxin production potential and the detection of toxin genes among strains of the *Bacillus cereus* group isolated along the dairy production. Thesis Wageningen Univ., The Netherlands 2008.
36. Wijnands L. M.: *Bacillus cereus* associated food borne disease: quantitative aspects of exposure assessment and hazard characterization. Thesis Wageningen Univ., The Netherlands 2008.
37. Yang I. Ch., Shin D. Y. Ch., Huang T. P. H., Yun P. W., Jan P. T. M.: Establishment of a novel multiplex PCR assay and detection of toxinogenic strains of the species in the *Bacillus cereus* group. *J. Food Prot.* 2005, 68, 2132-2130.
38. Zhou G., Zheng D., Dou L., Cai Q., Yuan Z.: Occurrence of psychrotolerant *Bacillus cereus* group strains in ice creams. *Int. J. Food Microbiol.* 2010, 137, 143-146.

Adres autora: prof. dr hab. inż. Elżbieta Daczowska-Kozon, ul. Papieża Pawła VI 3, 71-459 Szczecin; e-mail: elzbieta.daczowska-kozon@zut.edu.pl