

# Przeżywalność enterotoksycznych *Bacillus cereus* w warunkach imitujących środowisko żołądka człowieka

ANNA BERTHOLD, JOANNA RAMATOWSKA

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

Berthold A., Ramatowska J.

## Survival of *Bacillus cereus* enterotoxic strains in medium simulating human stomach environment

### Summary

The aim of this work was to determine the survival of spores and vegetative cells of enterotoxic strains of *B. cereus* in a medium (GM-milk) simulating human stomach environment after consumption of milk or dairy products. Gastric medium (GM-milk) was prepared by mixing equal volumes of a gastric electrolyte solution (4.8 g/l NaCl, 1.56 g/l NaHCO<sub>3</sub>, 2.2 g/l KCl, 0.22 g/l CaCl<sub>2</sub>, 500 U/l pepsin solution [Sigma-Aldrich Chemie GmbH, nr kat. P6887]) with UHT milk (0,5% fat content). The total count of *B. cereus* after 6-hours' incubation in GM-milk (pH~2 and pH~4,5) was determined in a MYP [Merck nr kat. 1.05267].

After incubating the spores or vegetative cells in a pH~4,5 medium, the count remained unchanged in 70% and 30% strains, decreased by about 1.0 log cfu/ml in 20% and 40% strains or decreased by about 2.0 log cfu/cm<sup>3</sup> in 10% and 30% strains, respectively. After incubating the spores in a pH~2 medium, the count remained unchanged in 10% strains, decreased by about 1.0 log cfu/cm<sup>3</sup> and 2.0 log cfu/cm<sup>3</sup> in 40% and 50% of the strains, respectively. In the same medium no survival of any tested strains of vegetative cells in 1 ml was ascertained after 1 hour incubation. The study demonstrated that the survival of *B. cereus* depended on the pH of the medium simulating the stomach environment and the physiological state of the cells (spores or vegetative forms).

**Keywords:** *B. cereus*, milk

*Bacillus cereus* jest jednym z najpowszechniej występujących w żywności drobnoustrojów chorobotwórczych. *B. cereus* izoluje się z mleka surowego, pasteryzowanego, serów podpuszczkowych dojrzewających, mlecznych napojów fermentowanych, mleka w proszku oraz wielu innych produktów żywnościowych (4, 5, 15). Drobnoustroje tego gatunku odpowiedzialne były za wywołanie od 1% do 22% przypadków zatruć pokarmowych w różnych krajach w latach 80. i 90. ubiegłego wieku (13).

*B. cereus* może wywoływać u człowieka zatrucia pokarmowe. Szczepy toksynotwórcze odpowiedzialne są za powodowanie dwóch typów zatruć: wymiotnego i biegunkowego. Zatrucie pokarmowe typu wymiotnego wywołane jest przez cereulidynę – toksynę wytworzoną przez *B. cereus* w zanieczyszczonej żywności. Do zatrucia dojść może także na skutek spożycia z zanieczyszczonej żywnością komórek lub przetrwalników *B. cereus*, które zasiedlają jelito cienkie człowieka i w tych warunkach wytwarzają enterotoksyny typu biegunkowego (tzw. toksykoinfekcje). Wyniki otrzymane przez Andersson i wsp. (2) potwier-

dziły w warunkach *in vitro*, że przetrwalniki *B. cereus* zdolne są do przylegania do komórek nabłonka jelitowego, co związane jest z hydrofobowością przetrwalników i do kiełkowania w warunkach podobnych do panujących w jelicie cienkim człowieka oraz tworzenia równocześnie enterotoksyny HBL. Prawdopodobieństwo wystąpienia zatrucia pokarmowego typu „biegunkowego” zależy więc ściśle od zdolności tych drobnoustrojów do przeżycia w warunkach kwasowości żołądka człowieka, a także odporności na działanie enzymów występujących w początkowym odcinku przewodu pokarmowego. W warunkach krajowych nie prowadzono dotychczas badań nad przeżywalnością *B. cereus* w środowisku żołądka.

Celem badań było określenie przeżywalności komórek wegetatywnych i przetrwalników enterotoksycznych szczepów *B. cereus*, pochodzących z mleka surowego i środowiska pozyskiwania mleka, w warunkach imitujących środowisko panujące w żołądku człowieka po spożyciu zanieczyszczonego przez *B. cereus* mleka lub produktów mlecznych.

## Materiał i metody

Badania nad przeżywalnością przetrwalników i komórek wegetatywnych *B. cereus* w warunkach symulujących środowisko żołądka człowieka przeprowadzono w pożywce GM-Milk, w skład której wchodził wodny roztwór soli mineralnych, mleko oraz pepsyna, do której wprowadzono odpowiednie formy komórek badanych szczepów. Wartości pH pożywki, którą zastosowano, dobrano według danych otrzymanych w czasie badań klinicznych przeprowadzonych przez Dressman i wsp. (10) nad kwasowością soku żołądkowego. Niższe pH ~2 odzwierciedla kwasowość soku żołądkowego po spożyciu żywności na czczo, natomiast pH ~4,5 – po spożyciu kolejnej porcji żywności, czyli w przypadku, kiedy pokarm dostaje się do żołądka o znacznym wypełnieniu.

Do badań użyto 10 enterotoksycznych, hemolitycznych szczepów *B. cereus* pochodzących z powierzchni strzyków, z mleka surowego oraz z powierzchni kubków udojowych. Zakres badań obejmował określenie przeżywalności każdego ze szczepów w pożywce symulującej warunki panujące w żołądku człowieka (GM-Milk) w następujących wariantach: A: inkubacja przetrwalników *B. cereus* w pożywce GM-Milk o pH ~2,0 lub pH ~4,5, czas: 6 h, temperatura 37°C, 250 obr./min.; B: inkubacja komórek wegetatywnych *B. cereus* w pożywce GM-Milk o pH ~2 lub pH ~4,5, czas: 6 h, temperatura 37°C; 250 obr./min.

W wariancie A z rysowego wzrostu badanego szczepu na pożywce MYP pobierano eżącą pewną ilość materiału biologicznego, przenoszono do próbki zawierającej 10 cm<sup>3</sup> jałowego 0,85% roztworu NaCl i dokładnie mieszano. Uzyskaną w ten sposób zawiesinę ogrzewano w temperaturze 80°C przez 10 minut w celu zabicia form wegetatywnych, a następnie schładzano. Oznaczano w niej liczbę *B. cereus* na pożywce MYP (Merck nr kat. 1.05267). Zawiesinę wstawiano do wody lodowej o temperaturze około 2°C, gdzie pozostawała aż do uzyskania wyników o liczbie przetrwalników *B. cereus* w 1 cm<sup>3</sup> tej zawiesiny.

Do siedmiu równoległych kolb zawierających po 50 cm<sup>3</sup> pożywki GM-Milk (pożywka GM o składzie: 4,8 g/l NaCl, 1,56 g/l NaHCO<sub>3</sub>, 2,2 g/l KCl, 0,22 g/l CaCl<sub>2</sub>, 500 U/l pepsyny (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, nr kat. P6887) i mleko 0,5% tł. w stosunku 1 : 1) i regulowano jej pH za pomocą jałowego 6 M roztworu HCl do wartości: pH ~2,0 lub ~4,5. Następnie do każdej z kolb dodawano taką objętość zawiesiny przetrwalników *B. cereus*, aby liczba przetrwalników *B. cereus* w 1 cm<sup>3</sup> pożywki wynosiła około 10<sup>6</sup> j.t.k. Wszystkie kolby, z wyjątkiem jednej, w której oznaczano początkową liczbę *B. cereus* w 1 cm<sup>3</sup> pożywki oraz dokonywano pomiaru pH, przenoszono do wytrząsarki i inkubowano w temperaturze 37°C przy wytrząsaniu 250 obr./min. Co godzinę wyjmowano z łaźni jedną kolbę i oznaczano liczbę *B. cereus* w 1 cm<sup>3</sup> pożywki.

W wariancie B z płytki ze wzrostem rysowym *B. cereus* na pożywce MYP pobierano eżącą pewną ilość materiału biologicznego, przenoszono go do kolby zawierającej 50 cm<sup>3</sup> bulionu odżywczego (Merck, nr kat. 1.05443) i inkubowano w temperaturze 34°C przez 18 godzin, 130 obr./min. Z tak otrzymanej zawiesiny komórek wegetatywnych *B. cereus* wykonywano posiew powierzchniowy na pożywkę MYP, w celu określenia liczby *B. cereus*. W tym czasie zawiesinę przetrzymywano w temperaturze ok. 2°C. Następnie postępowano identycznie, jak w wariancie A.

Tab. 1. Zmniejszenie liczby *Bacillus cereus* w czasie 6 godzin inkubacji w temperaturze 37°C w pożywce symulującej warunki panujące w żołądku człowieka

Forma komórek	Odsetek szczepów wykazujących zmniejszenie liczby w czasie inkubacji (log j.t.k./cm <sup>3</sup> )					
	pH ~2,0			pH ~4,5		
	< 1	≥ 1-2	≥ 2-3	< 1	≥ 1-2	≥ 2-3
Przetrwalniki	40%	50%	10%	90%	10%	-
Komórki wegetatywne	NB*			40%	40%	20%

Objaśnienie: \*NB – brak obecności w 1 cm<sup>3</sup> pożywki po pierwszej godzinie inkubacji u wszystkich badanych szczepów

## Wyniki i omówienie

Otrzymane wyniki przedstawiono w tab. 1. Stwierdzono wysoką oporność przetrwalników *B. cereus* na warunki symulujące środowisko panujące w żołądku człowieka po spożyciu mleka zanieczyszczonego tymi drobnoustrojami. Po inkubacji przetrwalników *B. cereus* w pożywce o pH ~4,5 zaobserwowano, iż u 90% badanych szczepów ogólna liczba *B. cereus* nie zmieniła się lub zmniejszyła się o najwyżej 1 rząd wielkości, a u pozostałych szczepów spadek sięgał do 2 rzędów wielkości. Liczby *B. cereus* po inkubacji wynosiły od około 10<sup>4</sup> do około 10<sup>6</sup> j.t.k./cm<sup>3</sup>.

W przypadku zastosowania inkubacji przetrwalników w pożywce o pH ~2, ogólna liczba *B. cereus* u 40% badanych szczepów utrzymała się na niezmiennym poziomie w czasie trwania doświadczenia lub zmniejszyła się o najwyżej 1 rząd wielkości. W przypadku 50% szczepów odnotowano jej spadek o 1-2 rzędy wielkości, a u pozostałych 10% szczepów liczba *B. cereus* zmniejszyła się o 2 do 3 rzędów wielkości. Końcowa liczba *Bacillus cereus* po sześciu godzinach inkubacji wynosiła od około 10<sup>2</sup> do około 10<sup>5</sup> j.t.k. w 1 cm<sup>3</sup> pożywki. Przetrwalniki wszystkich badanych szczepów wykazywały więc znaczną oporność na kwasowość soku żołądkowego, typową dla sytuacji, kiedy pokarm przyjmowany jest na czczo (pH ~2).

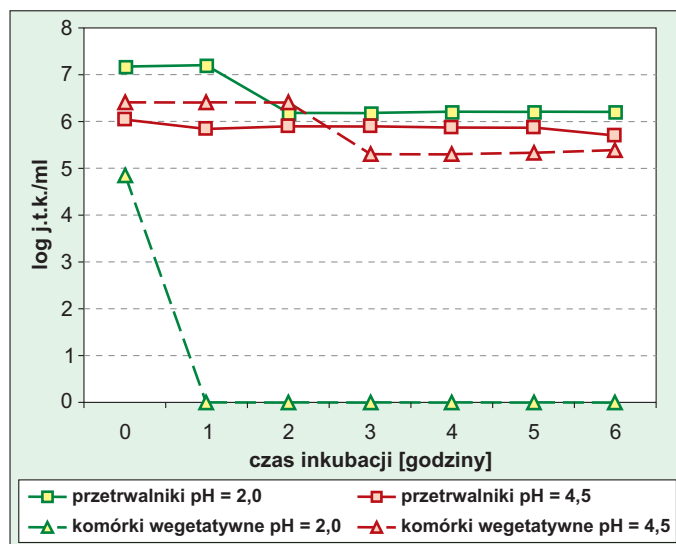
Podobne wyniki badań otrzymali Clavel i wsp. (6). Autorzy badali przeżywalność przetrwalników *B. cereus* w medium imitującym środowisko panujące w żołądku człowieka. Doświadczenia prowadzili w kilku wariantach kwasowości pożywki, w zakresie od 1,0 do 5,2. Porównywali także przeżywalność *B. cereus* w trzech różnych pożywkach symulujących środowisko żołądka, tj. po spożyciu mleka, warzyw lub kurczęcia. Stwierdzili, że przetrwalniki były odporne na wszystkie badane wartości pH. Największy spadek ich liczby wynosił około 2 rzędy logarytmiczne po 6 godzinach inkubacji w najniższym stosowanym pH pożywki i tylko w przypadku inkubacji przetrwalników w pożywce zawierającej wyciąg z warzyw. W przypadku inkubacji przetrwalników *B. cereus* w pożywce z dodatkiem mleka lub mięsa drobiu nie zaobserwowano istotnych zmian liczby w żadnej z badanych wartości pH. Wyniki te świadczą o ochronnym działaniu składników środowiska, takich jak białko i tłuszcz na przetrwalniki podda-

ne działaniu czynnika stresującego, jakim jest wysoka kwasowość.

Odmienne wyniki badań otrzymano w przypadku zaszczerpienia pożywki komórkami vegetatywnymi *B. cereus*. Rezultatem eksperymentu na komórkach vegetatywnych, w pożywce o pH ~2 była śmierć komórek wszystkich szczepów, już po pierwszej godzinie inkubacji. W pożywce GM-Milk o pH ~4,5 u 40% szczepów nastąpił spadek liczby komórek vegetatywnych o najwyżej 1 rząd wielkości, u kolejnych 40% szczepów liczba komórek spadła o od ponad 1 do 2 rzędów wielkości, natomiast u 20% liczba komórek zmniejszyła się o 2-3 rzędy logarytmiczne. Końcowa liczba komórek vegetatywnych wynosiła  $10^3$ - $10^5$  j.t.k./ $cm^3$ . Komórki vegetatywne wszystkich badanych szczepów wykazały się więc zróżnicowaną, ale jednak zdolnością do przeżycia inkubacji w pożywce o pH ~4,5. Co bardziej zaskakujące, u części szczepów zaobserwowano podobną przeżywalność komórek vegetatywnych, jak i przetrwalników w czasie inkubacji w pożywce o wyższym pH.

Na ryc. 1 przedstawiono zmianę liczby komórek jednego ze szczepów (wyizolowany z mleka surowego), który odznaczył się największą opornością na zastosowane warianty inkubacji. Przetrwalniki tego szczepu wykazały oporność na oba zastosowane warianty pH pożywki. Ich liczba w czasie trwania obu eksperymentów nie uległa znaczącym zmianom. W przypadku inkubacji przetrwalników w pożywce o pH ~2,0 ich liczba w pierwszej godzinie pozostała bez zmian w stosunku do liczby początkowej, ale już w drugiej godzinie nastąpił spadek o 1 rząd wielkości (do  $1,5 \times 10^6$  j.t.k./ $cm^3$ ) i na tym poziomie liczba komórek pozostawała do 6 godziny inkubacji. W pożywce o pH ~4,5 liczba przetrwalników zmieniała się równomiernie, ale nieznacznie i w ostatniej godzinie inkubacji była mniejsza od początkowej o mniej niż 1 rząd logarytmiczny.

W przypadku inkubacji komórek vegetatywnych wymienionego szczepu w pożywce o pH ~4,5 stwierdzono zmniejszenie ich liczby w czasie trwania eksperymentu o około 1 rząd wielkości, a więc podobnie jak dla przetrwalników w niższym pH, przy czym przez pierwsze 2 godziny inkubacji liczba komórek pozostawała na poziomie początkowym ( $2,5 \times 10^6$  j.t.k./ $cm^3$ ), a dopiero w 3. godzinie nastąpił spadek do liczby  $2,0 \times 10^5$  j.t.k./ $cm^3$  i w kolejnych godzinach liczba komórek pozostawała na mniej więcej niezmiennym poziomie. W pożywce o pH ~2,0 już po godzinie trwania inkubacji nie stwierdzono obecności *B. cereus* w  $1 cm^3$  pożywki. Identyczne eksperymenty na komórkach vegetatywnych przeprowadzili Clavel i wsp. (6). Wykazali przeżywalność komórek vegetatywnych w pH > 4,3 bez względu na zastosowaną pożywkę. We wszystkich wariantach pożywek, ale w zakresie pH 5,1-5,7 zaobserwowali nawet wzrost liczby *B. cereus* wynoszący od 1 do 3 rzędów logarytmicznych w  $1 cm^3$ . Badania wymienionych autorów przyniosły także interesujące informacje dotyczące krzywych śmierci dla komórek vegetatywnych w pożywce GM-Milk (pH ~3,6)



Ryc. 1. Zmiany liczby szczepu *Bacillus cereus* pochodzącego z mleka surowego w czasie inkubacji w pożywce GM-Milk (37°C/6 h)

i GM-Chicken (pH ~3,2). W obu rodzajach pożywek obserwowano gwałtowny spadek liczby komórek, sięgający powyżej 3 rzędów wielkości w pierwszej godzinie inkubacji, natomiast w kolejnych godzinach liczba *B. cereus* pozostawała na niezmiennym poziomie. Może to świadczyć o obecności w stosowanym inokulum pewnej niewielkiej liczby komórek vegetatywnych wysoko opornych na kwasowy czynnik stresujący. Wyniki otrzymane w niniejszych badaniach wydają się potwierdzać taką tezę.

Podsumowując, w przypadku komórek vegetatywnych *B. cereus* potwierdzono ochronny wpływ mleka jako medium. Był on już wcześniej obserwowany przez innych badaczy, według których spowodowany był obecnością tłuszczu oraz białek w produktach mlecznych (8). Teoria ta sprawdziła się również w niniejszych badaniach. Waterman i Small (20) wykazali, że przeżywalność w mielonej wołowinie bakterii wrażliwych na niskie wartości pH, takich jak *Salmonella typhimurium*, *Schigella flexneri* i *Escherichia coli*, była możliwa dzięki temu, iż mięso zwiększa pH kwaśnego środowiska tych bakterii. Działanie chroniące bakterie często obserwowane jest także w warunkach *in vivo*. Drouault i wsp. (11) stwierdzili większą przeżywalność *Lactococcus lactis* w żołądku szczurów po podaniu zwierzętom pokarmu. Jednym z wniosków, jakie wyciągnęli Clavel i wsp. (6) było stwierdzenie, iż liczba *B. cereus* zdolna do przeżycia w żołądku ściśle zależy od rodzaju pożywienia, z którym komórki tego drobnoustroju wprowadzane są do organizmu człowieka.

Ponadto, w zdecydowanej większości przypadków (wyjątkiem były komórki vegetatywne w pożywce o pH ~2) końcowa liczba przetrwalników i komórek vegetatywnych *B. cereus* była większa niż  $10^3$  j.t.k./ $cm^3$ , co związane jest z dawką niebezpieczną dla zdrowia konsumenta. Przyjmuje się, że wszystkie produkty, które w 1 g lub  $1 cm^3$  zawierają więcej niż  $10^3$  j.t.k.

*B. cereus* nie mogą być uznane za bezpieczne dla zdrowia człowieka (13, 15).

Najbardziej istotnym wnioskiem wypływającym z wyników przeprowadzonych badań oraz niektórych danych piśmiennictwa (6) jest, iż na przeżywalność *B. cereus* w środowisku kwaśnym bezpośredni wpływ ma forma komórek (komórki wegetatywne lub przetrwalniki) wprowadzonych do organizmu. Taki rezultat był jednak oczekiwany z racji powszechnej wiedzy na temat oporności przetrwalników (16). Znanych jest bowiem kilka czynników biorących udział w oporności form przetrwalnych *Bacillus sp.* na przynajmniej niektóre chemiczne czynniki stresujące. Ważną funkcję w odpowiedzi na stres chemiczny, w tym kwasowy, wydaje się pełnić, przede wszystkim przy pierwszym kontakcie, ściana przetrwalnika, która stanowi barierę dla czynników zewnętrznych. Następnym czynnikiem wspomagającym jest nieprzenikliwość jądra przetrwalników dla substancji hydrofilnych, niska zawartość wody we wnętrzu przetrwalnika oraz ochrona jego materiału genetycznego przez białka  $\alpha/\beta$  – typ SASP (białka rozpuszczalne w środowisku kwaśnym).

Obserwacją reakcji *B. cereus* (szczep TZ415 wyizolowany z żywności) na warunki niskiego pH zajęli się również Jobin i wsp. (14). Zauważyli oni, że komórki tego szczepu nie były wrażliwe na pH ~5. To zjawisko było już wcześniej opisane dla *Bacillus* i *Clostridium* przy ekspozycji ich komórek na niskie pH (12). W niniejszych badaniach, w zbliżonym pH, około 4,5, obserwowano również przeżywalność komórek wegetatywnych *B. cereus*. Możliwość *B. cereus* przeżycia w warunkach niskiego pH zależy od fazy wzrostu, w jakiej znajdują się te drobnoustroje (14). Reakcja tolerancji kwasowej (ATR) była indukowana w komórkach różnych gatunków *Bacillus* w późnej fazie stacjonarnej. Takie wyniki zgadzały się z wynikami uzyskanymi dla *Listeria monocytogenes* (17) i *Lactococcus lactis* (1), dla których ATR była indukowana, gdy komórki wchodziły w stacjonarną fazę wzrostu. Komórki wegetatywne *B. cereus*, których użyto w niniejszych badaniach, również pochodziły ze stacjonarnej fazy wzrostu. Po zetknięciu się tych komórek z niskimi wartościami pH (około 4,5), doszło najprawdopodobniej do reakcji tolerancji kwasowej (ATR), co sprawiło, że komórki wegetatywne większości badanych szczepów przeżyły w tych warunkach.

Pomimo że *B. cereus* zdolny jest do wzrostu w pH 4,3-9,0 (3), minimalne pH zmienia się dla różnych szczepów oraz zależy od rodzaju czynnika zakwaszającego. Wykazano (3, 7), że pewien wpływ ma temperatura inkubacji. W bulionie mózgowo-sercowym zakwaszonym do pH ~5 za pomocą HCl, nie występował rozwój przetrwalników *B. cereus* w temperaturze 7°C i 10°C, niemniej jednak przetrwalniki kiełkowały w temperaturze 20°C. Podobne wyniki uzyskano dla gotowanego purée z marchwi (18). Potwierdzono także zdolność rozwoju *B. cereus* w soku cytrynowym o pH ~5 w temperaturze inkubacji 8°C (9) oraz w bulionach

marchwiowym i cukiniowym zakwaszonych kwasem cytrynowym do pH ~5 w temperaturze 12°C (19).

## Wnioski

1. Przeżywalność *Bacillus cereus* w warunkach imitujących środowisko panujące w żołądku człowieka po spożyciu zanieczyszczonych tym drobnoustrojem mleka lub produktów mlecznych zależy od pH oraz formy komórek (przetrwalniki czy komórki wegetatywne).

2. Przetrwalniki *B. cereus* są dużo bardziej odporne na wartości pH ~2 panujące w żołądku człowieka niż komórki wegetatywne.

3. Komórki wegetatywne *B. cereus* wykazują porównywalną oporność, jak przetrwalniki na inkubację w pożywce o pH ~4,5 imitującej warunki panujące w żołądku.

## Piśmiennictwo

1. Alemayehu D., O'Sullivan E., Condon S.: Changes in acid tolerance of *Lactococcus lactis* during growth of constant pH. Intern. J. Food Microbiol. 2000, 55, 215-221.
2. Andersson A., Granum P., Ronner U.: The adhesion of *Bacillus cereus* spores to epithelial cells might be an additional virulence mechanism. Intern. J. Food Microbiol. 1998, 39, 93-99.
3. Benedict R., Partridge T., Wells D., Buchanan R.: *Bacillus cereus*: aerobic growth kinetics. J. Food Prot. 1993, 56, 211-214.
4. Berthold A., Gibowicz H.: Występowanie *Bacillus cereus* w rynkowych produktach mleczarskich. Przegląd Mlecz. 2005, nr 12, 4-6.
5. Berthold A., Molska I.: Występowanie *Bacillus cereus* w mleku surowym. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość. 2002, 32, 3 supl., 8-17.
6. 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, 1-6.
7. Chorin E., Thualt D., Cleret J., Bourgeois C.: Modelling *Bacillus cereus* growth. Intern. J. Appl. Microbiol. 1997, 38, 229-234.
8. D'Aoust J.: Infective dose of *Salmonella typhimurium* in cheddar cheese. Am. J. Epidemiol. 1985, 122, 717-719.
9. Del Torre M., Della Corte M., Stecchini M.: Prevalence and behaviour of *Bacillus cereus* in REPFED of Italian origin. Intern. J. Food Microbiol. 2001, 63, 199-207.
10. Dressman J., Berardi R., Dermentzoglou L., Russel T., Schmalts S., Barnett J., Jarvenpaa K.: Upper gastrointestinal (GI) pH in young, healthy men and women. Pharm. Res. 1990, 7, 756-761.
11. Drouault S., Corthier G., Ehrlich D., Renault P.: Survival, physiology and lysis of *Lactococcus lactis* in the digestive tract. Appl. Environ. Microbiol. 1999, 65, 4881-4886.
12. Everis L., Betts G.: pH stress can cause cell elongation in *Bacillus* and *Clostridium* species: a research note. Food Control 2001, 12, 53-56.
13. Granum P., Lund T.: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. FEMS Microbiol. Lett. 1997, 157, 223-228.
14. Jobin M., Clavel T., Carlic F., Schmitt P.: Acid tolerance response is low-pH and late-stationary growth phase inducible in *Bacillus cereus* TZ 415. Intern. J. Food Microbiol. 2002, 79, 65-73.
15. Kramer J., Gilbert R.: Foodborne Bacterial Pathogens. *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. Marcel Dekker Inc., New York 1989, 21-70.
16. Nicholson W., Munakata N., Horneck G., Melosh H., Setlow P.: Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. Microbiol. Molec. Biol. Rev. 2000, 64, 548-572.
17. O'Driscoll B., Gahan C., 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.
18. Valero M., Fernandez P., Salmeron M.: Influence of pH and temperature on growth of *Bacillus cereus* in vegetable substrates. Intern. J. Food Microbiol. 2003, 82, 71-79.
19. Valero M., Leonidis S., Fernandez P., Martinez A., Salmeron M.: Growth of *Bacillus cereus* in natural and acidified carrot substrates over the temperature range 5-30°C. Food Microbiol. 2000, 17, 605-612.
20. Waterman S., Small P.: Acid-sensitive enteric pathogens are protected from killing under extremely acidic conditions of pH 2,5 when there are inoculated onto certain solid food sources. Appl. Environ. Microbiol. 1998, 64, 3882-3886.

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