

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Anja Palman

**TOKSIGENOST SEVOV BAKTERIJE VRSTE *Bacillus cereus* IZ
ŽIVIL**

DIPLOMSKO DELO
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ

**TOXIGENICITY OF *Bacillus cereus* STRAINS ISOLATED FROM
FOOD**

GRADUATION THESIS
UNIVERSITY STUDIES

Ljubljana, 2006

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Praktični del diplomske naloge smo opravili v Laboratorijih za sanitarno mikrobiologijo Inštituta za varovanje zdravja Republike Slovenije v Ljubljani, in na Katedri za živilsko mikrobiologijo Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete. Biometodo z merjaščevim semenom smo izvedli v Laboratoriju Klinike za reprodukcijo in konje Veterinarske fakultete v Ljubljani.

Odbor za študijske zadeve univerzitetnega študija živilske tehnologije je za mentorico diplomskega dela imenoval prof. dr. Sonjo Smole Možina in za recenzentko prof. dr. Natašo Poklar Ulrih.

Mentorica: prof. dr. Sonja Smole Možina

Recenzentka: prof. dr. Nataša Poklar Ulrih.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član: prof. dr. Sonja Smole Možina

Član: prof. dr. Nataša Poklar Ulrih

Datum zagovora:

Diplomska naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Anja Palman

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 579.22:615.9(043)=863
KG	bakterije / <i>Bacillus cereus</i> / hemoliza / toksini / enterotoksini / emetični toksini / BCET-RPLA / gibljivost merjaščeveh semenčic / živost merjaščeveh semenčic
AV	PALMAN, Anja
SA	SMOLE MOŽINA, Sonja (mentorica), POKLAR ULRIH, Nataša (recenzentka)
KZ	1000 Ljubljana, SLO, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI	2006
IN	TOKSIGENOST SEVOV BAKTERIJE VRSTE <i>Bacillus cereus</i> IZ ŽIVIL
TD	diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	X, 57 s., 16 pregl., 7 sl., 73 ref.
IJ	SL
JI	sl / en
AI	<p>Prisotnost bakterij <i>Bacillus cereus</i> smo ugotavljali v 130 vzorcih izbranih živil. V skladu z mednarodnim standardom ISO smo jih izolirali iz 16 vzorcev ter jim določili fenotipske lastnosti. Število preiskovanih sevov <i>Bacillus cereus</i> smo povečali s sevi iz obstoječih zbirk na skupno 49 sevov iz živil in tri referenčne, emetično pozitivne seve. Z encimsko – imunskim testom BCET-RPLA smo ugotavljali zmožnost tvorbe diarealnih enterotoksinov in jo potrdili pri 26 sevih iz živil (53 %). Vpeljali smo tudi metodo za ugotavljanje toplotno obstojnega emetičnega toksina na osnovi merjenja zmanjšane gibljivosti merjaščevega semena, po izpostavitvi semena metanolnemu ekstraktu bakterijske biomase. Ugotovili smo, da je za izvedbo te metode med najpomembnejšimi dejavniki uporaba visoko kakovostnega in standardiziranega semena, ki ima visoko začetno gibljivost pred in po dodatku metanola. Pomembna je tudi ustrezna koncentracija metanola v testni raztopini. Pokazali smo, da prisotnost emetičnega toksina v bakterijskemu ekstraktu močno zmanjša gibljivost semenčic. S primerjavo gibljivosti semena, izpostavljenega metanolnemu ekstraktu emetično pozitivnih sevov in metanolnemu ekstraktu sevov <i>B. cereus</i> iz živil smo potrdili en emetično pozitiven sev, ki smo ga izolirali iz testenin. Vpliv emetičnega toksina na semenčice smo ugotavljali s fluorogenimi barvili in s testom z resazurinom. Emetični toksin ni vplival na delež živih in mrtvih semenčic, zmanjšal pa je metabolično aktivnost semenčic. Za to meritev je potrebna ustrezna gostota uporabljenega semena.</p>

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Dn
DC UDC 579.22:615.9(043)=863
CX bacteria / *Bacillus cereus* / hemolysis / toxins / enterotoxins / emetic toxin / BCET-RPLA / boar semen motility / viability of boar semen
AU PALMAN, Anja
AA SMOLE MOŽINA, Sonja (supervisor), POKLAR ULRIH, Nataša (reviewer)
PP 1000 Ljubljana, SLO, Jamnikarjeva 101
PB Univ. of Ljubljana, Biotechnical Fac., Dep. of Food Sc. and Technol.
PY 2006
TI TOXIGENICITY OF *Bacillus cereus* STRAINS ISOLATED FROM FOOD
DT graduation thesis (university studies)
NO X, 57 p., 16 tab., 7 fig., 73 ref.
LA SL
AL sl/en
AB One hundred and thirty specific sources of food were analysed for the presence of *Bacillus cereus* regarding ISO international standard. These bacteria were isolated from 16 food samples and were phenotypically characterized. Another 33 isolates of *B. cereus* from the existing collections were included in further studying. By enzymatic-immunological BCET-RPLA test capability of diarrhoeal enterotoxins production was analysed and confirmed by 26 strains (53 %). Also in vitro boar sperm motility test was initiated. The test was based on computer analysis of motility of spermatozoa, which were exposed to methanol extract of bacterial biomass. We have ascertained that this method requires high quality and standardised semen, which is highly motile before and after addition of methanol. Suitable concentration of methanol in the test solution is also important. We have demonstrated that the presence of emetic toxin in the bacterial extract strongly reduces semen motility. By comparison of semen motility exposed to methanol extract of emetic positive strains and methanol extract of isolated *B. cereus* strains from food, we have confirmed one emetic positive isolate from pasta. We have been analysing an influence of emetic toxin to semen by fluorogenic stains and resazurin test. Emetic toxin did not affect the semen viability but it reduced metabolic activity of spermatozoa. For this measurement the suitable density of used semen is needed.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA -----	III
KEY WORDS DOCUMENTATION -----	IV
KAZALO VSEBINE -----	V
KAZALO PREGLEDNIC -----	VIII
KAZALO SLIK -----	IX
KAZALO OKRAJŠAV -----	X
1 UVOD -----	1
2 PREGLED OBJAV -----	3
2.1 ROD <i>Bacillus</i> -----	3
2.1.1 Klasifikacija in filogeneza-----	3
2.1.2 Pomen aerobnih sporogenih bakterij v živilstvu -----	4
2.2 <i>Bacillus cereus</i> -----	6
2.2.1 Taksonomija -----	6
2.2.2 Splošne morfološke, ekološke in genetske značilnosti bakterij <i>Bacillus cereus</i> -----	6
2.2.2.1 Izolacija in ugotavljanje koncentracije bakterij <i>B. cereus</i> v hrani in krmi ----	7
2.2.3 Toksigenost bakterije <i>B. cereus</i> -----	8
2.3 TOKSINI BAKTERIJ VRSTE <i>B. cereus</i> -----	10
2.3.1 Toplotno občutljivi enterotoksini-----	10
2.3.2 Toplotno obstojni emetični toksin - cereulid -----	11
2.3.2.1 Sinteza emetičnega toksina v živilih in mikrobioloških gojiščih -----	12
2.3.2.2 Delovanje cereulida na celične mitochondrije-----	13
2.4 METODE ZA ODKRIVANJE TOKSIGENIH SEVOV <i>B. cereus</i> -----	15
2.4.1 Test BCET- RPLA za dokazovanje enterotoksina -----	15
2.4.1.1 Princip testa BCET-RPLA-----	16
2.4.2 Biometoda za dokazovanje emetičnega toksina na osnovi zmanjšane gibljivosti merjaščevega semena-----	16
2.4.2.1 Občutljivost in ponovljivost testa-----	17
2.4.2.2 Gibljivost semena v povezavi z drugimi toksini-----	17
2.4.2.3 Testiranje metabolne aktivnosti merjaščevega semena z redukcijskim testom z resazurinom -----	18
2.4.2.4 Testiranje vitalnosti merjaščevega semena na osnovi barvanja s fluorogenimi barvili-----	18
2.3 CILJI DIPLOMSKEGA DELA -----	20
2.4 DELOVNE HIPOTEZE-----	20
3 MATERIAL IN METODE -----	21
3.1 NAČRT EKSPERIMENTA -----	21
3.1.1 Eksperimentalni načrt biometode za ugotavljanje tvorbe emetičnega toksina -----	22

3.2 MATERIAL -----	23
3.2.1 Bakterijski sevi-----	23
3.2.2 Mikrobiološka gojišča -----	24
3.2.3 Rastopine, barvila in ostale kemikalije-----	25
3.2.4 Vzorci merjaščevega semena -----	26
3.2.5 Laboratorijska oprema-----	26
3.3 METODE -----	27
3.3.1 Priprava vzorca živil, izolacija in biokemijska potrditev bakterij <i>B. cereus</i>	27
3.3.2 Revitalizacija sevov <i>B. cereus</i> iz stalnih zbirk-----	27
3.3.3 Detekcija enterotoksinov z revezno aglutinacijo lateksa (BCET-RPLA)----	27
3.3.4 Izbor sevov za nadaljnje poizkuse ugotavljanja tvorbe cereulida z merjaščevim semenom-----	28
3.3.5 Ugotavljanje tvorbe emetičnega toksina z merjaščevim semenom -----	28
3.3.5.1 Ugotavljanje zmanjšane gibljivosti merjaščevega semena pod vplivom metabolnega ekstrakta bakterijske biomase-----	28
3.3.5.2 Barvanje semena s fluorescentnimi barvili za ugotavljanje živosti semenčic-----	29
3.3.5.3 Postopek redukcijskega testa z resazurinom za ugotavljanje metabolične aktivnosti semenčic -----	29
3.3.7 Statistična analiza -----	30
4 REZULTATI -----	31
4.1 IZOLACIJA IN BIOKEMIJSKA POTRDITEV BAKTERIJ <i>B. cereus</i> IZ VZORCEV ŽIVIL IN NEKATERIH OKOLJSKIH VZORCEV -----	31
4.2 CONA HEMOLIZE IN TVORBA ENTEROTOKSINOV ANALIZIRANIH SEVOV <i>B. cereus</i> -----	32
4.3 IZBOR SEVOV ZA NADALJNI POIZKUS Z BIOMETODO Z MERJAŠČEVIM SEMENOM-----	35
4.3.1 Lastnosti sevov, ki dokazano tvorijo emetični toksin - cereulid -----	53
4.4 REZULTATI MERJENJA ZMANJŠANE GIBLJIVOSTI MERJAŠČEVEGA SEMENA POD VPLIVOM METANOLNEGA EKSTRAKTA BAKTERIJSKE BIOMASE -----	36
4.4.1 Vpliv kakovosti semena na izvedbo poizkusov -----	36
4.4.1.1 Vpliv metanola na gibljivost in živost semenčic-----	37
4.4.1.2 Vpliv metanola in metanolnega ekstrakta bakterijske biomase na metabolično aktivnost semenčic -----	38
4.4.2 Rezultati poizkusa z 2,5 % metanolnim ekstraktom in s standardiziranim vzorcem semena -----	39
4.4.2.1 Gibljivost semena-----	39
4.4.2.2 Rezultati barvanja semenčic s fluorescentnimi barvili po izpostavitvi metanolnemu ekstraktu-----	41
4.4.2.3 Rezultati redukcijskega testa z resazurinom kot merila metabolične aktivnosti semenčic -----	42
5 RAZPRAVA -----	44
5.1 IZOLACIJA IN BIOKEMIJSKA POTRDITEV BAKTERIJ <i>B. cereus</i> IZ VZORCEV ŽIVIL IN NEKATERIH OKOLJSKIH VZORCEV -----	44

5.2 CONA HEMOLIZE IN TVORBA ENTEROTOKSINOV ANALIZIRANIH SEVOV <i>B. cereus</i> -----	44
5.3 IZBOR SEVOV ZA NADALJNI POIZKUS Z BIOMETODO Z MERJAŠČEVIM SEMENOM-----	46
5.4 REZULTATI MERJENJA ZMANJŠANE GIBLJIVOSTI MERJAŠČEVEGA SEMENA POD VPLIVOM METANOLNEGA EKSTRAKTA BAKTERIJSKE BIOMASE -----	47
5.4.1 Vpliv kakovosti semena na izvedbo poizkusov-----	47
5.4.1.1 Vpliv metanola na gibljivost in živost semenčic-----	47
5.4.1.2 Vpliv metanola in metanolnega ekstrakta bakterijske biomase na metabolično aktivnost semena-----	47
5.4.2 Rezultati poizkusa z 2,5 % metanolnim ekstraktom in s standardiziranim vzorcem semena -----	48
5.4.2.1 Gibljivost semena-----	48
5.4.2.2 Rezultati barvanja s fluorescentnimi barvili-----	49
5.4.2.3 Rezultati redukcijskega testa z resazurinom za ugotavljanje metabolične aktivnosti semenčic -----	49
6 SKLEPI -----	50
7 ZAHVALA -----	51
8 REFERENCE-----	52

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Primerjava obeh sindromov zastrupitve -----	9
Preglednica 2: Emetično pozitivni sevi <i>B. cereus</i> -----	23
Preglednica 3 : Sevi <i>B. cereus</i> iz trajnih zbirk, ki so bili preiskovani v tem diplomskem delu, z navedbo živila, iz katerega so bili sevi izolirani -----	23
Preglednica 4: Sevi, izolirani na osnovi standardnega postopka izolacije iz živil in okoljskih vzorcev ter njihove fenotipske značilnosti-----	32
Preglednica 5: Izvor, cona hemolize in sposobnost tvorbe enterotoksinov sevov, ki so bili shranjeni v stalnih zbirkah-----	34
Preglednica 6: Prikaz velikosti cone hemolize na KA in tvorbe enterotoksinov za seve, ki dokazano tvorijo emetični toksin -----	35
Preglednica 7: Rezultati meritev lastnosti merjaščevih semenčic z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri pred izvedbo poizkusov -----	37
Preglednica 8: Razlike v opazovanih parametrih merjaščevih semenčic med eksperimentalnimi skupinami (model 1, Duncanov test, $P = 0,05$): pred in po dodatku metanola oz. metanolnega ekstrakta bakterijske biomase -----	37
Preglednica 9: Vpliv dodatka metanola oz. metanolnega ekstrakta bakterijske biomase na absorbanco po barvanju semenčic z resazurinom, v odvisnosti od časa meritve -----	38
Preglednica 10: Prikaz gibljivosti merjaščevega semena za negativno kontrolo poizkusa	39
Preglednica 11: Prikaz gibljivosti merjaščevega semena po izpostavitvi metanolnemu ekstraktu emetično pozitivnih sevov <i>B. cereus</i> : pozitivna kontrola poizkusa -----	39
Preglednica 12: Prikaz gibljivosti semena po izpostavitvi metanolnemu ekstraktu izbranih izolatov <i>B. cereus</i> iz živil -----	40
Preglednica 13: Prikaz povprečnih deležev močno poškodovanih (mrtvih) in nepoškodovanih (živih) semenčic v vzorcu merjaščevega semena, izpostavljenega topilu (metanolu) in metanolnemu ekstraktu izbranih izolatov <i>B. cereus</i> -----	41
Preglednica 14: Povprečne vrednosti izmerjene absorbance pri valovni dožini 610 nm in 575 nm pred in po 40-minutni inkubaciji merjaščevega semena- za negativno kontrolo redukcijskega testa z resazurinom -----	42
Preglednica 15: Povprečne vrednosti izmerjene absorbance pri valovni dožini 610 nm in 575 nm pred in po 40-minutni inkubaciji merjaščevega semena z ekstraktom emetično pozitivnih sevov <i>B. cereus</i> - za pozitivno kontrolo testa -----	42
Preglednica 16: Povprečne vrednosti izmerjene absorbance pri valovni dožini 610 nm in 575 nm pred in po 40-minutni inkubaciji merjaščevega semena z ekstraktom izbranih izolatov <i>B. cereus</i> -----	43

KAZALO SLIK

Slika 1: Kemijska struktura cereulida (Ehling – Schulz, 2004b) -----	11
Slika 2: Mitohondriji merjaščevih semenčic pred in po izpostavitvi cereulidu (Mikkola, 1999; Salkinoja-Salonen, 2006) -----	14
Slika 3: Prikaz semenčic po barvanju s fluorogenimi barvili, vidnih s pomočjo fluorescentnega mikroskopa (Salkinoja-Salonen, 2006)-----	19
Slika 4: Prikaz poteka eksperimentalnega dela, opravljenega v okviru diplomske naloge -	21
Slika 5: Načrt biometode za ugotavljanje tvorbe emetičnega toksina z merjaščevim semenom -----	22
Slika 6: Prikaz tipičnih kolonij bakterij <i>B. cereus</i> na selektivnem gojišču MEYP-----	31
Slika 7: Primerjava cone hemolize med emetično pozitivnim sevom in sevom, izoliranim iz živil, ki ni tvoril emetičnega toksina -----	46

KAZALO OKRAJŠAV

BCET-RPLA	imunološka metoda za ugotavljanje hemolitičnega diarealnega enterotoksina
BDEVIA	imunološka metoda za ugotavljanje hemolitičnega diarealnega enterotoksina
BF	Biotehniška fakulteta
BHI	gojišče za izvedbo komercialnega testa BCET-RPLA
Hbl	hemolitični diarealni enterotoksin
IVZ	Inštitut za varovanje zdravja RS, Ljubljana
KA	krvni agar
LC-MS	tekočinska kromatografija z masno spektrometrijo
MEYP, MYP	selektivno gojišče za izolacijo bakterij vrste <i>Bacillus cereus</i>
Nhe	nehemolitični diarealni enterotoksin
NRPS	neribosomalna peptid sintetaza
PCR	verižna reakcija s polimerazo
PI	propidijev jodid
VP	medij Voges-Proskaver oz. test za ugotavljanje razgradnje glukoze do acetilmetilkarbinola (acetoin) ob majhni tvorbi kislin
cfu/g	število kolonijskih enot kot merilo kot merilo živih celic v g vzorca

1 UVOD

Varnost ali zdravstvena neoporečnost je ob prehranski vrednosti in senzorični kakovosti eden temeljnih kakovostnih parametrov hrane. Varnost hrane mora biti zagotovljena in nedvoumno ima pri tem odločilen pomen mikrobiologija (Žlender, 2003). Znanstvena in strokovna literatura opisujeta več kot 200 poznanih bolezni, prenosljivih s hrano. Med njimi so zelo pomembne toksikoinfekcije, ki jih povzročajo mikroorganizmi, ki se prenašajo in/ali razmnožujejo s hrano (Smole Možina in Hočevnar Grom, 2004).

Precejšnje tveganje v živilski industriji predstavljajo bakterije iz rodu *Bacillus*, in sicer zaradi svoje vesplošne razširjenosti in zmožnosti tvorbe spor, ki so zelo odporne na toploto, sušenje, radiacijo in ostale negativne vplive iz okolja. V hrani se pojavljajo predvsem kot kontaminanti, ki povzročajo kvar. Znano pa je tudi veliko toksikoinfekcij, ki so jih povzročile bakterije tega rodu.

Bakterijam vrste *Bacillus cereus* pripisujejo največ toksikoinfekcij med bakterijami, ki spadajo v rod *Bacillus*. Povzročajo dva sindroma zastrupitve: emetični sindrom in diarealni sindrom. Emetični sindrom spremlja bruhanje, ki se pojavi v nekaj urah po zaužitju kontaminirane hrane. Pri diarealnem sindromu zastrupitve, ki ga povzročajo enterotoksini, pa se simptomi pokažejo v osmih do šestnajstih urah po zaužitju in se kažejo v obliki trebušnih bolečin, krčev in diareje. V večini primerov sta oba sindroma relativno blaga in ne trajata več kot 24 ur (Ehling-Schulz in sod., 2004b; Leuschner, 2003; Horwood in sod., 2004; Granum in Baird-Parker, 2000). Vseeno pa je bilo prijavljenih nekaj hujših oblik obeh sindromov. Znani so smrtni primer po zaužitju hrane, ki je bila visoko kontaminirana z emetičnim toksinom in trije smrtni primeri, ki so bili posledica delovanja nekrotičnih enterotoksinov (Ehling-Schulz in sod., 2005b).

Vzrok zastrupitve s hrano, inficirano z *B. cereus*, je tvorba različnih tipov toksinov. Emetični sindrom povzroča toplotno stabilen peptidni toksin, imenovan cereulid in je posledica intoksikacije s toksini v kontaminirani hrani. Diarealni sindrom zastrupitve pa je posledica infekcije z enterotoksigenimi bakterijami *B.cereus*, ki tvorijo toplotno občutljive enterotoksine v tankem črevesju (Ehling-Schulz in sod., 2004b; Jääskeläinen in sod., 2004).

S porastom objav o toksikoinfekcijah s hrano so se začele razvijati tudi metode za odkrivanje toksigenih oz. patogenih mikroorganizmov. Za detekcijo enterotoksigenih sevov *B. cereus* so razvite različne diagnostične metode, najpomembnejše temeljijo na polimerazni verižni reakciji ali encimsko – imunskih testih (Ehling-Schulz in sod., 2004b). Tak je tudi test BCET-RPLA (Oxoid), ki zaznava L2 komponento hemolizina (Hbl) in pa test BDEVIA (Tecra), s katerim lahko določimo dve beljakovinski komponenti nehemolitičnega enterotoksina (Nhe) (Beecher in Wong, 1994).

Za detekcijo cereulida in emetično pozitivnih sevov še ni razvitih komercialnih testov, so pa bile opisane naslednje metode: biometoda z merjaščevimi semenčicami, citotoksična analiza na Hep-2 celicah, LC-MS (tekočinska kromatografija z masno spektrometrijo) in metoda za odkrivanje toksigenih sevov, imenovana metoda PCR, kjer gre za

pomnoževanje genov, ki nosijo zapis za toksine. Znani pa so še starejši testi hranjenja opic z inficirano hrano, s katerimi lahko glede na simptome zastrupitve sklepamo na prisotnost toksina oz. toksigenih sevov v hrani (Ehling-Schulz in sod., 2004b).

V našem delu smo pridobili seve bakterije *B. cereus* s standardnim postopkom izolacije iz živil in iz že obstoječih zbirk (BF, Katedra za živilsko mikrobiologijo in IVZ RS, Odd. za sanitarno mikrobiologijo) ter jih fenotipsko okarakterizirali. Ugotavljali smo tvorbo enterotoksinov z imunskim testom (BCET-RPLA) in vpeljali metodo za ugotavljanje tvorbe emetičnega toksina na osnovi zmanjšane gibljivosti merjaščevega semena. S primerjalno analizo zbranih rezultatov smo želeli preveriti delovno hipotezo, da sevi *B. cereus*, izolirani iz živil, sintetizirajo različne tipe toksinov in da obstaja povezava med nekaterimi fenotipskimi lastnostmi sevov in njihovo sposobnostjo tvorbe toksinov. Dodatno smo v eksperimentalno delo vključili tudi ugotavljanje preživeljivosti merjaščevih semenčic in zmanjšanje njihove metabolne aktivnosti, s pomočjo resazurina, kot posledice izpostavitve bakterijskemu ekstraktu s toksinom. Preveriti smo želeli hipotezo, da je tudi ta eksperimentalni pristop uporaben za odkrivanje emetično pozitivnih sevov *B. cereus*.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ROD *Bacillus*

Rod *Bacillus* je sestavljen iz raznolike skupine Gram pozitivnih, sporogenih, aerobnih ali fakultativno anaerobnih bakterij, ki so paličaste oblike in so zelo razširjene v naravi. Zaradi sporogenosti so zelo odporne na različne okoliščine. Razmnožujejo se lahko v širokem spektru okolij; v vodah, v številnih živilskih surovinah, med živilskimi procesi, v toplotno obdelani hrani itd. (From in sod., 2005).

Njihove značilnosti vključujejo sposobnost razgradnje velikega števila substratov rastlinskega ali živalskega izvora (npr. celuloza, škrob, pektin, beljakovine, maščobe). Nekateri predstavniki rodu imajo zmožnost produkcije antibiotikov, nitrifikacije, denitrifikacije in tudi fiksacije dušika. V rodu najdemo fakultativne litotrofe, autotrofe, acidofile, alkalofile, psihrotrofe in termofile (Todar's Online Textbook of Bacteriology, 2005).

2.1.1 Klasifikacija in filogeneza

Zgodnji poizkusi klasifikacije bakterij vrste *Bacillus* so bili osnovani na dveh karakteristikah: aerobni rasti in tvorbi endospor. Rezultat te klasifikacije je bil povezovanje bakterij, ki imajo različno fiziologijo in živijo v zelo raznolikih življenjskih okoljih (Todar's Online Textbook of Bacteriology, 2005).

Filogenetska klasifikacijska shema opredeljuje dva glavna tipa endosporogenih bakterij. To so klostridiji in bacili, ki so gram-pozitivni. Razred **Bacilli** vsebuje red **Bacillales** in družino **Bacillaceae**. V tej družini je nekaj novih rodov in seveda rod **Bacillus**.

Vse bakterije *Bacillus* spp., ki lahko povzročijo zastrupitev s hrano, uvrščamo v mezofilne vrste. Te pa so nadalje razdeljene v tri skupine. Oportunistično patogene so uvrščene v 1. skupino. Ta skupina sestoji iz Gram-pozitivnih bakterij, ki tvorijo elipsoidne oz. cilindrične spore. Večina bakterij iz te skupine bi lahko rasla aerobno in anaerobno. Nadalje je 1. skupina razdeljena na 1 A in 1 B oddelek in sicer na osnovi celičnih dimenzij in specifičnih lipidnih globul v citoplazmi. Bakterije v oddelku 1 A so večje od 0,9 µm in vsebujejo lipidne globule v citoplazmi. To so bakterije *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides* in *B. anthracis*. Bakterije, ki so manjše od 0,9 µm, sodijo v 1 B oddelek: *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus* in *B. coagulans* (Todar's Online Textbook of Bacteriology, 2005).

2.1.2 Pomen aerobnih sporogenih bakterij v živilstvu

V živilski industriji se rod *Bacillus* pojavlja predvsem kot kontaminent, ki povzroča kvar živil in lahko pri ljudeh povzroči toksikoinfekcije. Zaradi svoje vsesplošne razširjenosti in zmožnosti tvorbe spor, ki so zelo odporne na toploto, sušenje, radiacijo in ostale negativne vplive okolja, predstavljajo te bakterije precejšnje tveganje v živilski industriji. Ker so bakterije tega rodu tako razširjene, pride tudi do kontaminacije hrane zelo hitro. Bakterije s proteolitичno, lipolitичno in saharolitичno aktivnostjo pa povzročajo kvar živil (Leuschner, 2003).

Eden od vzrokov, da so sporogeni mikroorganizmi tako pogosto prisotni v živilih oz. v njihovi proizvodnji, je tudi hidrofobnost njihovih spor, ki je mnogo večja kot pri vegetativnih celicah. Hidrofobnost povečuje adhezivno sposobnost spor na hidrofobnih površinah, ki so pogoste v živilski industriji (npr. nerjaveče jeklo). Tako se tvorijo biofilmi, ki še povečajo odpornost mikrobnih celic na zunanje vplive (Smole Možina, 2004). Biofilm je definiran kot akumulacija mikrobnih celic, ki so se pritrile in se namnožile na abiotičnih ali bioloških površinah. Biofilme lahko tvorijo spore in vegetativne celice, ki se pritrjujejo na različne površine (Ryu in Beuchat, 2005). K povečani tvorbi biofilmov poleg hidrofobnosti spor, pripomore tudi njihova morfologija. Na površini spor se nahajajo posebni izrastki, ki pripomorejo k pritrjevanju na površine (Andersson in sod., 1995).

Spore bakterij vrste *B. cereus* so bolj hidrofobne od ostalih spor iz rodu *Bacillus*. To pa poveča sposobnost pritrjevanja le-teh na različne površine in s tem je oteženo odstranjevanje spor med čiščenjem in dezinfekcijo (Leuschner, 2003). Ryu in Beuchat (2005) sta v svoji raziskavi ugotovila, da lahko *Bacillus cereus* tvori biofilme tudi na površini hrane. V raziskavi je bilo tudi potrjeno, da so bakterije v biofilmu veliko bolj odporne na strese iz okolja (npr. na visoko temperaturo in na kemikalije, ki se uporabljajo med sanitacijo). S tem se možnost kontaminacije in posledično infekcije še poveča.

V surovinah, namenjenih za industrijsko predelavo, se bakterije iz rodu *Bacillus* večinoma pojavljajo v koncentraciji, ki ni zadostna za ogrožanje zdravja potrošnika. To pa kaže na to, da spore ali celice bakterij rodu *Bacillus* potrebujejo ustrezne pogoje za kaljenje in namnožitev v hrani (Leuschner, 2003). Spore v stanju mirovanja ohranijo sposobnost zaznavanja sprememb v okolju. Če zaznajo pozitivne dražljaje iz okolja (npr. povečana koncentracija hranil, dvig temperature...) se odzovejo s kaljenjem v aktivne vegetativne celice. Tveganje torej nastopi, ko živilo, ki vsebuje viabilne spore, rehidriramo, odmrzujemo, pripravljamo gotove jedi itd. (Smole Možina, 2004).

Znano je veliko toksikoinfekcij, ki so jih povzročile sporogene bakterije iz rodu *Bacillus*. *B. cereus* je pogosto izolirana bakterija iz različnih živil in površin, kjer potekajo industrijski procesi. Je oportunistično patogena bakterija, ki je že velikokrat povzročila zastupitve z različnimi živilmi, kar je podrobneje opisano v kasnejših poglavjih. Pirttijärvi in sod. (2000) pa so npr. izolirali *B. cereus* iz embalaže (lepenka in papir), ki je namenjena za živilsko industrijo. Novejše raziskave kažejo, da je hrana v prahu za dojenčke (mlečne formule) lahko močno kontaminirana z isto bakterijo (Shaheen in sod., 2006). *B. cereus* in *B. subtilis* sta bila izolirana tudi iz drugih skupin živil, kot so npr. mleko in mlečni izdelki,

kvas, jedi iz makaronov in riža, čokolada, pekarski in mesni izdelki, zelišča ter začimbe (Leuschner, 2003). *B. subtilis* je znan tudi kot povzročitelj zastrupitve z jedmi kot so: jedi z mesom in zelenjavo, rižota z morskimi sadeži, kruh in testenine, sendviči in pice. Infektivna doza je višja od 10^5 CFU/g, inkubacijska doba je od 10 min do 14 ur in trajanje simptomov 2-8 ur. *B. subtilis* je tudi najpogostejši povzročitelj nitkavosti kruha, ki se kaže kot lepljivost le-tega in se pojavlja večinoma v poletnem času, ko so pogoji za rast bakterij najugodnejši. *B. stearothermophilus* in *B. coagulans* sta znana povzročitelja kvara evaporiranega mleka in drugih mlečnih izdelkov, ki dobijo kiselkast okus. Tudi *B. licheniformis* je že povzročil toksikoinfekcijo z mesnimi in zelenjavnimi jedmi, s kruhom in tudi testeninami. Infekcijska doza je nad 10^6 CFU/g. Prav tako je tudi *B. pulmus* že povzročil zastrupitve s hrano (mesne jedi, paradižnikova omaka v konzervi in podobno) (Leuschner, 2003).

Bakterije iz rodu *Bacillus* tvorijo tudi izvencelične encime in s tem povzročajo kvarjenje živil. Encimi so saharolitični, lipolitični in proteolitični. *B. subtilis* in *B. licheniformis* tvorita amilaze in povzročata hidrolizo škroba. To se lahko odrazi kot že omenjena nitkavost kruha. Spore v sredici kruha preživijo peko in vzklijejo, če je kruh hranjen na toplem (Baily in Holy, 1993). Z izvenceličnimi proteolitičnimi encimi bakterije razgrajujejo beljakovine do peptidov. V mleku bakterijska proteolitična aktivnost povzroči hidrolizo kazeina in ostalih beljakovin. S tem pride do želiranja UHT mleka, sladkega sesirjenja in grenkega priokusa mleka. Do kvara mleka lahko pride tudi pri temperaturah hladilnika. Najpogosteje povzročajo njegov kvar *B. cereus*, *B. subtilis* in tudi *B. macerans*. V kontaminiranem siru pa pride do napak v teksturi. Z lipolitičnimi encimi razgrajujejo maščobo. V mleku se to kaže kot sladkast priokus in je posledica nastalih prostih maščobnih kislin. Fosfolipaza in lecitinaza, ki razgrajujeta globularno membrano maščobne kroglice, povzročata grenak okus kontaminirane smetane (Meer in sod., 1991).

2.2 *Bacillus cereus*

2.2.1 Taksonomija

B. cereus je Gram pozitivna, sporogena, oportunistično patogena bakterija. Uvrščamo jo v *Bacillus cereus* skupino. V to skupino uvrščamo šest bakterij iz rodu *Bacillus*:

Bacillus cereus, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycooides*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus weihenstephanensis* in *Bacillus anthracis*. Med temi šestimi bakterijami je bila kljub veliki raznolikosti v virulentnih dejavnikih ugotovljena visoka genetska sorodnost. Na podlagi te informacije pa je bilo predlagano, da bi celotna skupina predstavlja eno samo vrsto (Ehling-Schulz in sod., 2005a).

Za *B. cereus* je bila razvita shema serotipov, ki je osnovana na flagelarnih antigenih. Poznanih je 42 serotipov. Nekatere pogosteje povezujejo z emetičnim toksinom (serotip 1, 3 in 8), druge pa s toplotno občutljivimi enterotoksini (serotipi 1, 2, 6, 8, 10 in 19). Serotip 1 je najpogosteje prisoten pri zastrupitvah s hrano po vsem svetu. Do sedaj še ni znane genetske povezave med virulentnimi dejavniki in flagelarnimi antigeni. Taka povezava je malo verjetna (Granum in Baird-Parker, 2000).

2.2.2 Splošne morfološke, ekološke in genetske značilnosti bakterij *Bacillus cereus*

Celice *B. cereus* so pod mikroskopom 3 – 5 μm dolge, 1,0 – 1,22 μm široke, gibljive, paličaste oblike, s peritrihnimi bički. Spore so elipsoidne in centralno nameščene (Bergere, 1992). Kaljenje spor poteka v temperaturnem območju od -1 do -59 $^{\circ}\text{C}$, optimalna temperatura je 30 $^{\circ}\text{C}$ (Te Giffel in sod., 1997). Pri optimalni temperaturi imajo spore germinacijski čas le 20 – 30 minut.

Večina sevov *B. cereus* je mezofilna in optimalno rastejo pri T od 30 $^{\circ}\text{C}$ do 40 $^{\circ}\text{C}$. V rahlo kisli hrani rastejo tudi pod 15 $^{\circ}\text{C}$ in nad 55 $^{\circ}\text{C}$ (Granum in Baird-Parker, 2000). Drugi avtorji pa omenjajo ožje optimalno temperaturno območje rasti, in sicer od 28 do 35 $^{\circ}\text{C}$ (Väisänen s sod., 1991; Baron s sod., 1994). Drugače pa naj bi rast potekala v širšem temperaturnem območju od 4 do 62 $^{\circ}\text{C}$. Nekateri sevi so lahko tudi psihrotrofi in lahko rastejo pri T od 4 $^{\circ}\text{C}$ do 6 $^{\circ}\text{C}$ (maksimalna T rasti pa je pri teh od 30 $^{\circ}\text{C}$ do 35 $^{\circ}\text{C}$) (Granum in Baird-Parker, 2000). Odpornost spor na toploto je prav tako variabilna. Baron s sod. (1994) so preizkušali odpornost spor *B. cereus* pri različnih temperaturah, v istem mediju (v vodi) in dobili široke intervale D vrednosti. D vrednost pomeni čas pasterizacije pri določeni temperaturi, ki je potreben, da dosežemo decimalno redukcijo (90 %) mikrobne populacije. $D_{100\text{ }^{\circ}\text{C}}$ je bil od 6,7 do 8,3 minute, $D_{95\text{ }^{\circ}\text{C}}$ od 5 do 36 min in $D_{90\text{ }^{\circ}\text{C}}$ je bil od 21 do 137 min. Večina spor pa ima zmerno odpornost na toploto ($D_{121\text{ }^{\circ}\text{C}}$ je 0,03 minute) (Granum in Baird-Parker, 2000). Odkrili so tudi spore z visoko toplotno odpornostjo ($D_{121\text{ }^{\circ}\text{C}}$ je znašala 2,35 minut). Spore serotipa 1 so v večini bolj toplotno odporne. Maščobe pa lahko še povečajo njihovo toplotno odpornost.

Vrednost pH za optimalno rast znaša od 6,0 do 7,0. Drugače pa je možna rast v pH območju od 5,0 do 8,8. Prav tako so opazili rast pod vrednostjo a_w 0,93 (Granum in Baird-Parker, 2000). Drugi avtorji pa omenjajo optimalno rast *B. cereus* pri pH vrednosti od 4,3 do 9,3, pri koncentraciji NaCl do 18 %, vodni aktivnosti a_w 0,92 in v aerobnih ter fakultativno anaerobnih pogojih (Väisänen s sod., 1991; Baron s sod., 1994).

Med specifične lastnosti posamezne bakterijske vrste sodi tudi njen dedni material. Pri bakteriji *B. cereus* je genski material organiziran v en sam velik kromosom, ali v manjši kromosom z večimi velikimi, obstojnimi plazmidi. Kromosom pri tej vrsti je velik med 2,4 do 6,3 Mb (Leonard s sod., 1998). Raznolikost med sevi *B. cereus* pa izhaja iz plazmidnega prenosa. Plazmidi pri tej vrsti so večji kot 50 kb. Konjugacijski sistem pri teh vrstah je zelo učinkovit, kar omogoča uspešen prenos genskega materiala med sevi *B. cereus* (Daffonchio s sod., 1998). Velikost kromosoma je pri sevih *B. cereus* raznolika tudi zaradi različnega števila kopij rRNK. Mnoge bakterije imajo namreč v svojem genomu pomnožene kopije operonov rRNK. Pri vrsti *B. cereus* so našli 10 takih kopij, pri ostalih vrstah iz rodu *Bacillus* pa 3-5 kopij (Gürtler in Stanisich, 1996; Daffonchio s sod., 1998).

Emetično pozitivni sevi *B. cereus* naj bi imeli gen, ki nosi zapis za encim, imenovan neribosomalna peptid-sintetaza (NRPS), kateri naj bi sodeloval pri tvorbi emetičnega toksina cereulida (Ehling-Schulz in sod., 2004a; Ehling-Schulz in sod., 2005a; Horwood in sod., 2004). Ta gen in tudi sam encim NRPS pa sta tudi glavna akterja pri novejših raziskavah, ki temeljijo na metodi PCR.

2.2.2.1 Izolacija in ugotavljanje koncentracije bakterij *B. cereus* v hrani in krmi

Mednarodni standard ISO 7932:2004(E) opisuje horizontalno metodo za štetje vitalnih bakterij *B. cereus*. Metoda je uporabna za preiskavo vseh izdelkov, namenjenih za človeško prehrano, krme za živali in tudi za preiskavo vzorcev okolja, ki predstavlja neposredno bližino hrane pri njeni manipulaciji.

Metoda temelji na treh zaporednih stopnjah:

Inokulacija in inkubacija: Direktna nacepitev vzorcev na selektivno gojišče MYP. Cepimo 0.1 ml tekočega vzorca oz. začetne suspenzije za ostale vzorce ali ustrezno decimalno razredčitev vzorca ali matične raztopine na gojišče. Inkubiramo pri 30°C v aerobnih pogojih, od 18 do 24 ur.

Najpogostejše uporabljeno selektivno gojišče je MYEPA (mannitol-egg yolk-polimyxin agar). Detekcija *B. cereus* temelji na hidrolizi jajčnega lecitina in iz manitola se ne tvori kislina. Selektivna komponenta v gojišču je polimiksin B, indikator pa fenol rdeče (Granum in Baird-Parker, 2000).

Štetje kolonij: Preštujemo vse morfološko značilne kolonije za *B. cereus* na ploščah, ki so številne (nimajo več kot 150 kolonij). Na podlagi tega preračunamo število bakterij na gram oz. mililiter vzorca po enačbi, ki jo podaja standard.

Kolonije, značilne za *B. cereus*, so velike, rožnate (indikacija, da ni potekla fermentacija manitola) in so obdane s posebno cono (zaradi kopičenja nastale lecitinaze oz. njenega netopnega produkta, ki se nalaga okrog kolonij).

Potrditev: Pet kolonij iz vsake plošče (ene razredčine) biokemično potrdimo: dobro ločene kolonije nacepimo na glukozni agar, VP in nitratni medij, na lecitinazni agar. Opravimo še test za hemolizo na krvnem agarju in pripravimo gramski preparat.

Rezultat, ki potrjuje bakterijo *B. cereus*: fermentacija glukoze, pozitivna reakcija VP, redukcija nitratov in po gramu pozitivni bacili ter različna cona hemolize.

2.2.3 Toksigenost bakterije *B. cereus*

Ker lahko spore bakterij iz rodu *Bacillus* preživijo kuhanje in tudi pasterizacijo ter začnejo kaliti in se namnoževati ob nepravilnem shranjevanju hrane, je intoksikacija z bakterijami tega rodu pogosta. Bakterije *B. cereus* so bile prvič izolirane kot povzročiteljice zastrupitve s hrano leta 1950 in sicer iz vanilijeve kreme. Od takrat so veljale bakterije te vrste za možne povzročiteljice diarealnega sindroma zastrupitve. Šele 20 let kasneje so prepoznali bakterije *B. cereus* kot povzročiteljice emetičnega sindroma (Ehling-Schulz in sod., 2004b).

Bakterije *Bacillus cereus* so večinoma povezane z zastrupitvami s hrano, ki je bila po toplotni obdelavi hranjena na sobni temperaturi dovolj časa. Nizka vrednost pH in dehidracija hrane ustavi rast bakterij te vrste. Hitra ohladitev hrane pod 10 °C pa preprečuje tvorbo toksinov in s tem toksikoinfekcije (Leuschner, 2003).

Bacillus cereus povzroča dva sindroma zastrupitve: emetični sindrom in diarealni sindrom. Emetični sindrom spremlja bruhanje, ki se pojavi v nekaj urah po zaužitju kontaminirane hrane. Pri sindromu zastrupitve, ki ga povzročajo enterotoksini, pa se simptomi pokažejo v osmih do šestnajstih urah po zaužitju in se kažejo v obliki trebušnih bolečin, krčev in diareje. V večini primerov sta oba sindroma relativno blaga in ne trajata več kot 24 ur (Ehling-Schulz in sod., 2004b; Leuschner, 2003; Horwood in sod., 2004; Granum in Baird-Parker, 2000). Vseeno pa je bilo prijavljenih nekaj hujših oblik obeh sindromov. Znani so smrtni primer po zaužitju hrane, ki je bila visoko kontaminirana z emetičnim toksinom in trije smrtni primeri, ki so bili posledica delovanja nekrotičnih enterotoksinov (Ehling-Schulz in sod., 2005b).

Vzrok zastrupitve s hrano, inficirano z *B. cereus*, je tvorba različnih tipov toksinov. Emetični sindrom povzroča toplotno stabilen peptidni toksin, imenovan cereulid. Podoben je enterotoksinu, ki ga tvorijo nekatere bakterije vrste *Staphylococcus* v hrani. Emetični sindrom je posledica intoksikacije s toksini v kontaminirani hrani. Drugi sindrom zastrupitve pa je posledica infekcije z enterotoksigeno bakterijo *B. cereus* (Ehling-Schulz in sod., 2004b). To pa pomeni, da tvorijo enterotoksine vegetativne bakterije ali spore, ki klijejo v tankem črevesju (Jääskeläinen in sod., 2004).

Preglednica 1: Primerjava obeh sindromov zastrupitve (Granum in Baird-Parker, 2000; Leuschner, 2003; Ehling-Schulz in sod., 2004b)

PRIMERJANE LASTNOSTI	EMETIČNI sindrom	DIAREALNI sindrom
Intoksikacijska/infekcijska doza	10^5 - 10^8 celic/g živila (znani primeri tudi pri 10^3 celic/g) 12-32 μ g toksina/kg	več kot 10^5 celic/g živila
Vrsta toksina	toplotno obstojen cereulid	toplotno neobstojni enterotoksini
Produkcija toksina	V hrani (25-35 °C) v začetku stacionarne faze rasti	V prebavnem traktu med vegetativno rastjo
Čas inkubacije bolezni	0,5-5 h po zaužitju (možno tudi po 6 h)	8-16 h po zaužitju
Trajanje simptomov	6-24 h	12-24 h
Simptomi	Bruhanje in slabost (včasih sledi tudi diareja- kasnejša produkcija enterotoksinov?)	Diareja, krči, bolečina
Najbolj pogosta hrana	Ocvrt in kuhan riž, testenine, mleko v prahu, mlečne formule za dojenčke	Meso in mesni izdelki, zelenjavne jedi, pudingi, omake, mleko
Struktura toksina	Cereulid: ciklični peptid	Proteini

2.3 TOKSINI BAKTERIJ VRSTE *B. cereus*

2.3.1 Toplotno občutljivi enterotoksini

Število enterotoksinov, ki so vključeni v izbruhe zastrupitve s hrano, se med posameznimi avtorji razlikuje. Granum in Lund (1997), McKillip (2000) ter Schoen in Wong (2005) povezujejo z toksikoinfekcijami dva proteinska kompleksa, hemolizin BL (Hbl) in nehemolitični enterotoksin (Nhe). Taylor in sod. (2005) pa v izbruhe zastrupitve s hrano vključujejo štiri enterotoksine, ki so jih odkrili pri raznovrstnih sevih: hemolizin BL (Hbl) in nehemolitični enterotoksin (Nhe) ter dva, ki sta kodirana z genom *entFM* oz. *cytK*.

Največ enterotoksinov se tvori med pozno eksponentno ali zgodnjo stacionarno fazo, pri optimalni temperaturi 32- 37 °C in pH 7,5. Nekateri sevi *B. cereus* tvorijo enterotoksine celo pri temperaturah, nižjih od 15 °C (McKillip, 2000). Pri segrevanju na 56 °C za 5 minut enterotoksini izgubijo aktivnost. Prav tako so občutljivi na nekatere proteaze, predvsem na encima tripsin in pepsin (Granum in Nissen, 1993). Seveda pa je tvorba enterotoksinov odvisna od vrste gojišča in zunanjih dejavnikov, kot so temperatura, vrednost pH, količina kisika in tudi prisotnost določenih ogljikovih hidratov. Tako so npr. sevi, ki so bili inkubirani na isti temperaturi in so imeli na razpolago več kisika, tvorili več hemolitičnega enterotoksina. Prav tako pospešuje tvorbo enterotoksinov prisotnost škroba in glukoze (McKillip, 2000).

Zastrupitev z diarealnimi enterotoksini bakterije *B. cereus* lahko povzroči hrana, ki vsebuje od 200 do 10⁹ bakterij na gram oz. mililiter. Tako velik razpon je postavljen zato, ker sevi tvorijo različno količino enterotoksinov. Zato velja tudi, da hrana, ki vsebuje več kot 10³ *B. cereus*/g, ni varna za uživanje (Lund in Granum, 1997).

Enterotoksin Hbl je sestavljen iz treh komponent B, L₁ in L₂. Hbl deluje hemolitično na eritrocite, levkocite in makrofage, dermonekrotično in vpliva na prepustnost žilnega sistema. Enterotoksin Hbl je zaradi teh lastnosti glavni virulentni faktor pri diarealnem sindromu. Sklepajo, da so za toksično delovanje Hbl potrebne vse tri komponente. Verjetno se komponenta B veže na površino tarčne celice, obe komponenti L pa povzročita lizo te celice. Možen pa je še drugačen mehanizem delovanja Hbl. Komponente Hbl naj bi se na tarčno celico vezale neodvisno in šele po tem naj bi se določil kompleks, ki bo napadel membrano. Posledično pa tudi ta mehanizem privede do lize celice (Granum in Lund, 1997; McKillip, 2000; Lindbäck in sod., 2004).

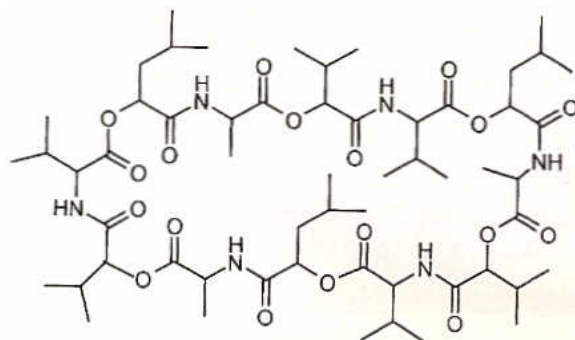
Enterotoksin Nhe je bil prvič izoliran iz Hbl- negativnih sevov *B. cereus*, ki so povzročili množično zastrupitev na Norveškem. Prav tako kot Hbl je sestavljen iz treh komponent, ki pa so različne. Sprva so v strukturo Nhe kompleksa vključevali tudi kolagenazo (velikost 105 kDa). Kasneje pa se je izkazalo, da to ni pravilno. Sekvenciranje operona, ki nosi zapis za komponento Nhe A in Nhe B, je razkrilo nov gen, ki nosi zapis za tretji protein oz. komponento, imenovano Nhe C (Lindbäck in sod., 2004).

Enterotoksin CytK deluje nekrotično, hemolitično in citotoksično za črevesne epitelne celice. Zato tudi povzroča diarejni sindrom. Prvič je bil izoliran pri sevih *B. cereus*, ki so povzročili hudo zastrupitev s hrano in posledično tudi smrt treh ljudi. Ti sevi niso imeli nobenega gena, ki bi vseboval zapis za katerikoli drug enterotoksin (Lund in sod., 2000).

2.3.2 Toplotno obstojni emetični toksin - cereulid

Emetični toksin bakterij *B. cereus*, imenovan cereulid, je majhen ciklični dodekadepsi-peptid in je kemijsko zelo podoben valinomycinu, ki ga tvori *Streptomyces griseus* (Agata in sod., 1994; Agata in sod., 1995). Tako kot enterotoksin bakterije *S. aureus* je tudi cereulid toplotno in kemijsko stabilen. Toksičen je že v zelo nizkih koncentracijah. Andersson in sod. (1998) cereulidu poleg toplotne stabilnosti prepisujejo še odpornost na proteaze, baze in kisline. Zato je obstojen v živilih in prebavnem traktu. Toksičen učinek so najprej opazovali na Hep-2 celicah, kjer je povzročil vakuolizacijo (Huges in sod., 1988; Szabo in sod., 1991). Toksičnost cereulida se kaže na mitohondrijih, saj deluje kot kalijev ionofor. Bilo je tudi objavljeno, da upočasni ali celo ustavi delovanje človeških naravnih celic ubijalk in zato ima tudi negativen vpliv na imunski sistem (Ehling-Schulz in sod., 2004b).

Naravne celice ubijalke igrajo pomembno vlogo pri obrambi pred infekcijo in malignostjo. Cereulid inhibira njihovo citotoksičnost in produkcijo citokina in sicer z nabrekanjem mitohondrijev. Efektivna doza je zelo majhna (20-30 µg/l) in učinek hiter. To pa pomeni, da koncentracija, ki povzroči zastrupitev s hrano, deluje tudi zaviralno na imunski odziv (Paananen in sod., 2002).



Slika 1: Kemijska struktura cereulida (Ehling- Schulz, 2004b)

2.3.2.1 Sinteza emetičnega toksina v živilih in mikrobioloških gojiščih

Največ cereulida se tvori na začetku stacionarne faze rasti *B. cereus*. Količina cereulida, ki ga bakterije proizvedejo, je odvisna od inkubacijske temperature, medija za rast, pH, prisotnosti kisika in specifičnih aminokislin. Prisotnost glukoze verjetno spodbuja produkcijo cereulida. Negativen učinek na produkcijo pa imajo prevelike zaloge leucina, isoleucina in glutaminska kislina (Ehling-Schulz in sod., 2004b). V hrani je bilo največ cereulida proizvedenega v rižu in testeninah, manj pa ga je bilo v kruhu in sladica (Shinagawa, 1990; Leuschner, 2003; Granum in Baird - Parker, 2000). Ni ga bilo v jajcih, mesnih izdelkih in mleku. Pri mleku v prahu in mlečnih formulah za dojenčke pa je bilo cereulida ponekod še več kot pri rižu (Holmes in sod., 1981; Ehling-Schulz, 2004b; Shaheen in sod. 2006). Mlečne formule imajo ustrezno sestavo (zrna in hranilne snovi), ki zelo spodbuja tvorbo cereulida (Shaheen in sod., 2006). Duc in sod. (2005) navajajo primer zastupitve dojenčka s pripravljeno otroško hrano. Rast *B. cereus* in tvorba emetičnega toksina pa je bila zaustavljena v jedeh s kisom, majonezo in paradižnikovo omako, verjetno zaradi nižje vrednosti pH (Agata in sod., 2002).

Optimalna temperatura za produkcijo cereulida naj bi bila od 15 °C do 30 °C. Pri temperaturi, višji od 37 °C, ni bilo zaznati produkcije emetičnega toksina (Jääskeläinen in sod., 2004). Ehling-Schulz in sod. (2004) so mnenja, da naj bi emetični sevi *B. cereus* tvorili toksin v temperaturnem območju od 10 pa vse do 40 °C. Jääskeläinen in sod. (2003) so v svoji raziskavi ugotovili, da se je cereulid tvoril v hrani, ki je vsebovala več kot 10^6 bakterij *B. cereus* /g, imela vrednost a_w večjo od 0,953 in vrednost pH je bila večja od 5,6. Pri temperaturah hladilnika (pod 15 °C) bakterije niso tvorile cereulida. Finlay in sod. (2002a) so ugotovili, da je najnižja temperatura, pri kateri so se bakterije *B. cereus* še razmnoževale in tvorile toksin, v kuhanem rižu 15 °C, na mikrobioloških gojiščih pa 12 °C. Pri 15 °C je bila sinteza cereulida celo večja kot pri 20 in 30 °C. Vendar pa je bil toksin pri 15 °C zaznaven po 48 h z najvišjo koncentracijo pri 72 h. Pri 20 in 30 °C pa je bil toksin zaznaven že po 24 h, najvišjo koncentracijo pa je dosegel po 72 h. Sinteza toksina pri 15 °C pa je bila zaznana pri nižjem številu bakterij.

Količina cereulida, ki ga bakterije *B. cereus* tvorijo, je odvisna tudi od vrste gojišča, tipa seva *B. cereus*, števila bakterij in količine prisotnega kisika. Mejna vrednost kisika, ki je potrebna za tvorbo cereulida, je 1,6 %. Pod to vrednostjo bakterije ne tvorijo več toksina (Rajkovic in sod., 2006). Tudi Finlay in sod. (2002 b) so ugotovili, da bakterije v aerobnih in mikroaerobnih pogojih tvorijo več cereulida. Tvorba cereulida pa se še poveča ob stresanju namnoženih kultur.

Odpornost emetičnega toksina na toploto je resnično zelo velika. Znan je podatek, da je prenesel toplotno obdelavo pri 126 °C kar 90 minut (Granum in Baird-Parker, 2000).

Glede na kemijsko sestavo cereulida lahko sklepamo, da se tvori encimatsko z neribosomalno peptid-sintetazo (NRPS). Izmenična peptidna in esterska vez, D-aminokislina in tudi ciklična struktura so pogosti produkti NRPSs. Ti NRPS encimi so veliki večnamenski proteini, ki imajo modularno organizacijo. Eden izmed modulov vsebuje vse katalitične aktivnosti, ki so potrebne za povezovanje aminokislinskih delov v peptidni produkt (Ehling-Schulz in sod., 2004b).

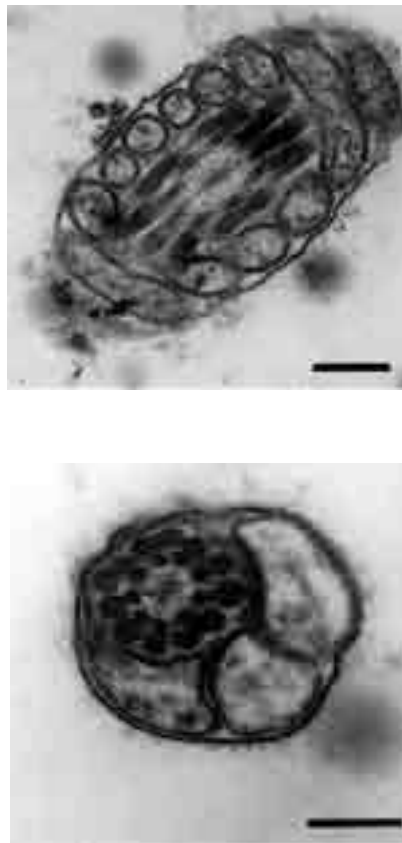
2.3.2.3 Delovanje cereulida na celične mitohondrije

Emetični toksin bakterije *B. cereus* zmanjša gibljivost semenčic in povzroča nabrekanje njihovih mitohondrijev. Do nabrekanja lahko pride zaradi več možnih mehanizmov delovanja cereulida. Najverjetneje pa je, da cereulid deluje kot K^+ ionofor. To so dokazovali s poskusi na mitohondrijih, vzetih iz podganjih jeter. Poizkusi kažejo, da cereulid (kot tudi valinomycin) dviguje koncentracijo K^+ iona s transportom v prisotnosti nitrata. Tudi respiracijski poizkusi potrjujejo delovanje cereulida kot specifičnega ionofora. Prisotnost cereulida v raztopini mitohondrijev, ki ne vsebuje K^+ iona, ne vpliva na raven respiracije in jo celo rahlo znižuje. Že majhen dodatek K^+ iona v raztopino pa je bil zadosten za stimulacijo respiracije (Mikkola in sod., 1999).

Notranja membrana mitohondrija je v normalnih okoliščinah nepropustna za K^+ . Ionofor (npr. cereulid ali valinomycin), ki je topen v maščobi, selektivno veže določen ion (v našem primeru K^+) na hidrofilno notranjost in ga prenese skozi membrano, ki je drugače nepropustna. Količina K^+ , ki preide v notranjost mitohondrijev, je sorazmerna z električnim potencialom; čimbolj je matriksna stran membrane negativna, tem več kationa preide v matriks mitohondrija (Lodish in sod., 2004)

Tudi Paananen in sod. (2002) menijo, da imajo mitohondrijski K^+ kanalčki dominantno vlogo pri kontroli volumna mitohondrija.

Najpomembnejšo vlogo pri gibljivosti semenčic ima proces oksidativne fosforilacije, ki poteka v mitohondrijih (Andersson in sod., 1998; Hoornstra in sod., 2003). Cereulid, ki deluje kot K^+ ionofor, upočasnjuje nastajanje ATP v procesu oksidativne fosforilacije in to zaustavi gibanje semenčic. Semenčice so pod vplivom cereulida le paralizirane in ne mrtve (Andersson in sod., 1998).



Slika 2: Mitochondriji merjaščevih semenčic pred in po izpostavitvi cereulidu (Mikkola, 1999; Salkinoja-Salonen, 2006)

Zgornja slika predstavlja rep semenčice, ki je bila izpostavljena ekstraktu seva *B. cereus*, ki ne proizvaja cereulida: mitochondriji imajo normalne oblike in velikosti. Spodnja slika pa prikazuje rep semenčice po izpostavitvi ekstraktu iz seva, ki je sposoben sinteze cereulida. Trije mitochondriji so počili in izgubili notranje strukture (Salkinoja-Salonen, 2006).

2.4 METODE ZA ODKRIVANJE TOKSIGENIH SEVOV *B. cereus*

S porastom objav o zastrupitvah in infekcijah s hrano so se začele razvijati tudi metode za odkrivanje toksigenih oz. patogenih mikroorganizmov. Za detekcijo enterotoksigenih sevov *B. cereus* so razvite različne diagnostične metode, najpomembnejše temeljijo na polimerazni verižni reakciji ali encimsko – imunskih testih (Ehling-Schulz in sod., 2004b). Tak je tudi test BCET-RPLA (Oxoid), ki zaznava L2 komponento hemolizina (Hbl) in pa test BDEVIA (Tecra), s katerim lahko določimo dve beljakovinski komponenti nehemolitičnega enterotoksina (Nhe). Test BCET-RPLA zazna Hbl toksin v koncentraciji 2 ng/ml, ne zazna pa Nhe toksina. Test BDEVIA pa zazna Nhe toksin v koncentraciji 1 ng/ml in ne zazna Hbl toksina (Beecher in Wong, 1994; Godič Torkar in Smole Možina, 2001).

Za detekcijo cereulida in emetično pozitivnih sevov še ni razvitih komercialnih testov, so pa bile opisane naslednje metode: citotoksična analiza na Hep-2 celicah, LC-MS (tekočinska kromatografija z masno spektrometrijo), biometoda z merjaščevimi semenčicami in metoda za odkrivanje toksigenih sevov imenovana metoda PCR, kjer gre za pomnoževanje genov, ki nosijo zapis za toksine. Znani pa so še starejši testi hranjenja opic z inficirano hrano s katerimi lahko glede na simptome zastrupitve sklepamo na prisotnost toksina oz. toksigenih sevov v hrani (Ehling-Schulz in sod., 2004b).

Citotoksična analiza temelji na tem, da cereulid v Hep-2 celicah povzroči tvorbo vakuol. Ta metoda je težko uporabna za rutinske namene, ker je potrebno preveč časa za prekultivacijo in pripravo vzorcev. Poleg tega pa ni občutljiva le na delovanje cereulida, ampak tudi na druge toksine. LC-MS analiza je zelo specifična, potrebna pa je draga oprema in dobro poučeno osebje. To pa naredi metodo manj privlačno za rutinske analize. PCR metoda je zelo primerna za detekcijo emetično pozitivnih sevov. Metoda je visoko specifična (Ehling-Schulz in sod., 2004a; Ehling-Schulz in sod., 2004b). Tudi tu je slabost draga oprema in potreba po usposobljenem kadru. Zraven tega pa ni možno zaznati, ali je toksin resnično prisoten v živilu.

Razvija se tudi metoda za določanje količine cereulida na osnovi merjenja porabe kisika v reakcijski mešanici, ki vsebuje mitohondrije iz podganjih jeter, ob prisotnosti cereulida. Funkcijska povezava med porabo kisika in koncentracijo cereulida v reakcijski mešanici omogoča kvantitativno določitev cereulida (Kawamura-Sato in sod., 2005).

2.4.1 Test BCET- RPLA za dokazovanje enterotoksina

Test BCET-RPLA je namenjen za detekcijo enterotoksinov na osnovi reverzne pasivne aglutinacije lateksa (RPLA).

V standardnih aglutinacijskih testih reagira specifično protitelo (topna substanca) s specifičnim antigenom, ki je pritrjen na določeno substanco. V reverznem aglutinacijskem testu pa je reakcija nekoliko obrnjena; protitelo je pritrjeno na določeno snov (v našem primeru lateks) in reagira s topnim antigenom. Lateks nima vpliva na potek same reakcije

in je zato pasivna substanca. Povezovanje lateks delcev (in nanj pritrjenih protiteles) v specifični protitelo-antigen reakciji, se kaže v vidni aglutinacijski reakciji.

Test BCET-RPLA se lahko uporablja za detekcijo enterotoksinov v hrani in za dokazovanje, da so sevi *B. cereus*, ki rastejo na ploščah, zmožni tvorbe enterotoksinov.

2.4.1.1 Princip testa BCET-RPLA

Polistiren lateks je povezan s čistim antigenom v t.i. lateks delce. Antigen dobivajo iz zajcev, ki so imuni na enterotoksine. Ti lateks delci ob prisotnosti enterotoksinov aglutinirajo. Kontrolni reagent vsebuje lateks delce, ki imajo namesto antigenov vezane ne imune zajčje globuline in mora vedno pokazati negativen rezultat. Test se izvaja na posebnih mikrotiterskih ploščicah. Če v ekstraktu hrane oz. bakterije ni enterotoksinov, se na dnu luknjic pojavi kompaktna tvorba. Ob prisotnosti enterotoksinov pa je na dnu opaziti le motni sloj.

Občutljivost testa za detekcijo enterotoksinov je 2 ng toksina na ml pripravljenega ekstrakta. Če je ekstrakt hrane pripravljen v razmerju 1:1 s priloženim reagentom, je občutljivost testa 4 ng toksina na g živila (BCET-RPLA instruction, 2006).

2.4.2 Biometoda za dokazovanje emetičnega toksina na osnovi zmanjšane gibljivosti merjaščevega semena

Biometoda za dokazovanje emetičnega toksina na osnovi zmanjšane gibljivosti merjaščevega semena je po mnenju avtorjev enostavna, hitra in ne zahteva posebne opreme. Namenjena je za hitro ločevanje emetično pozitivnih sevov od emetično negativnih sevov. Metoda je robustna, neobčutljiva na čas in način hranjenja plošč s kulturami bakterij. Izvede se lahko iz ene kolonije iz primarne plošče, ne potrebujemo čiste kulture. Cereulid, ki deluje kot kalijev ionofor, poškoduje mitohondrije in blokira oksidativno fosforilacijo, ki je potrebna za normalno gibljivost semenčic. Merjaščeve semenčice postanejo negibljive pri 37 °C v petih minutah po izpostavitvi toplotno obdelanemu ekstraktu, ki je pripravljen iz seva *B. cereus*, ki vsebuje cereulid (Andersson in sod., 2004).

Določene značilnosti semenčic, predvsem pa njihova gibljivost, so idealne za vlogo občutljivega indikatorja za detekcijo mitohondrijskih poškodb. Semenčice so neobčutljive na substance, ki vplivajo na sintezo proteinov ali na sintezo nukleinskih kislin, oziroma njihove regulacije. Vsi pomembni sistemi, ki delujejo v somatskih celicah, so dokazani tudi v semenčicah. Večina fizioloških mehanizmov v semenčicah je vodena z membranskim potencialom in prehodom ionov. Gibljivost semenčic je regulirana z mitohondrijsko polarizacijo in je zato ob izpostavitvi ionoforu zmanjšana. Vse te značilnosti postavljajo gibljivost merjaščevih semenčic v vlogo občutljivega indikatorja. Vse te značilnosti semenčic se izrazijo ob njihovi izpostavitvi toksinom, ki delujejo kot ionofori (Hoornstra in sod., 2003).

Biometodo za dokazovanje emetičnega toksina na osnovi zmanjšane gibljivosti merjaščevega semena so primerjali s kemijsko metodo, in sicer z LC-MS (tekočinska kromatografija z masno spektrometrijo). Analiziranih je bilo 14 sevov *B. cereus* z obema metodama. Vsi sevi, za katere je bilo s kemijsko metodo pokazano, da tvorijo cereulid (v konc. od 4 ng cereulida/ mg biomase do 400 ng cereulida/mg biomase), so zmanjšali gibljivost semenčic. Sevi, za katere kemijska metoda ni pokazala tvorbe cereulida, pa niso vplivali na gibljivost semenčic (Andersson in sod., 2004).

Gibljivost merjaščevih semenčic so opazovali tudi po njihovi izpostavitvi ekstraktu, pripravljenemu iz kuhanega riža, ki je bil inficiran z *B. cereus*. Ugotovljeno je bilo, da se je gibljivost semena zmanjšala, če je bil riž inficiran s sevom, ki je zmožen sinteze cereulida. Če pa je bil riž inficiran s sevi, ki ne tvorijo cereulida, je bila gibljivost semenčic nespremenjena. To dokazuje, da lahko cereulid zaznamo z odzivom semenčic, izpostavljenih ekstraktu, ki je pripravljen direktno iz hrane (Andersson in sod., 1998).

2.4.2.1 Občutljivost in ponovljivost testa

Povprečna razlika med ponovitvami testov in sicer s tremi različnimi vzorci merjaščevega semena in istim sevom *B. cereus*, je bila 20 %. Končna točka razredčitve metanol-ekstrakta na mililiter izpostavljenega semena, ki je povzročila zmanjšanje gibljivost za 50 %, je bila 0,5 ng toksina na ml semena. Občutljivost te metode je bila tako boljša, kot pri testu hranjenja opic in testu na Hep-2 celicah (Andersson in sod., 1998).

Kawamura-Sato in sod. (2005) menijo, da je občutljivost te metode na prisotni cereulid med vsemi zgoraj naštetimi metodami najvišja, in sicer z detekcijsko mejo pri 2 ng toksina/ml ekstrakta.

2.4.2.2 Gibljivost semena v povezavi z drugimi toksini

Ehling-Schulz in sod. (2004) menijo, da je slabost te metode občutljivost semenčic tudi na druge toksine, ki imajo podobno delovanje kot cereulid.

Toksini, ki imajo ionoforetične lastnost oz. tvorijo kanalčke in lahko delujejo na gibljivost semenčic, so npr. enterohemoragični hemolizin in difterijski toksin bakterije *Escherichia coli* in toksin, ki deluje na insekte, bakterije *B. thuringiensis* (Mikkola in sod., 1999).

Hoornstra in sod. (2003) so pokazali, da so merjaščeve semenčice zelo občutljive indikatorske celice za različne mitohondrijske toksine. Zato bi jih lahko uporabljali tudi za analizo drugih mitohondrijskih toksinov. Ti so poleg valomicina in cereulida še:

- gramicidin (A, B, C, D), ki ga tvori *Brevibacillus brevis* in deluje, kot protonofor
- nigericin, ki ga tvori *Streptomyces hygroscopicus* in izmenjuje K^+ z H^+ .
- salinomycin, ki ga tvori *Streptomyces albus* in je v bistvu K^+ ionofor.
- narasin, ki ga tvori *Streptomyces aureofaciens* in predstavlja antibiotik z ionoforetičnim delovanjem
- monensin, ki ga tvori *Streptomyces cinnamonensis* in je tudi ionofor

- kalcimicin
- eniatin, ki ga tvorijo plesni *Fusarium* sp.
- antimicin A, ki ga tvorijo *Streptomyces* sp.

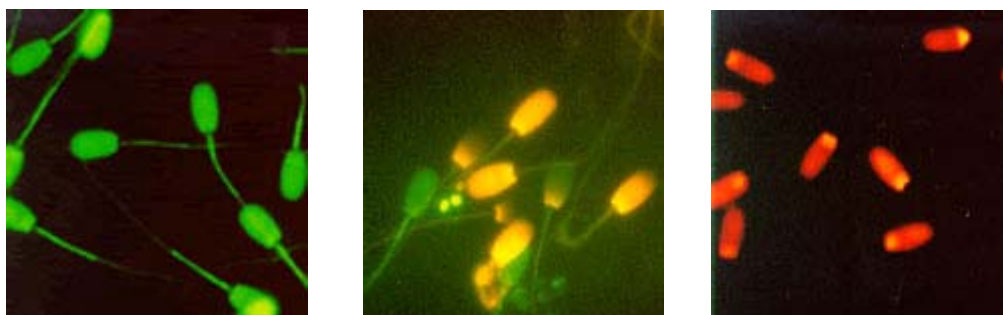
To so toksini, ki delujejo kot različni ionofori. Oligomicin (A, B, C), ionomicin in staurosporin pa poškodujejo mitohondrije z drugimi mehanizmi (Hoorstra, 2003).

2.4.2.3 Testiranje metabolne aktivnosti merjaščevega semena z redukcijskim testom z resazurinom

Redukcijski test z resazurinom temelji na dodatku resazurina, raztopljenega v fiziološki raztopini v vzorcu semena in inkubaciji raztopine v vodni kopeli (Fraser in sod., 2002). Metabolično aktivne semenčice povzročijo redukcijo resazurina (7-hydroxy-3H-phenoxazin-3-one 10-oxide) v resorufin. Spremembo barve iz modre (resazurin) v rožnato (resorufin) in naprej v belo (dihidroresorfin) ovrednotimo na podlagi barvne skale ali spektrofotometrično. Sprememba barve je v močni povezavi s koncentracijo gibljivih semenčic v vzorcu semena (Fuse in sod., 1993). Resazurin ima maksimum absorbance pri 610 nm. Njegova reducirana oblika (resorufin) pa ima maksimum absorbance pri 570 nm. Test z resazurinom ima najvišje povezave s koncentracijo semenčic, odstotkom gibljivosti in odstotkom živosti semenčic (Kunc, 2003).

2.4.2.4 Testiranje vitalnosti merjaščevega semena na osnovi barvanja s fluorescentnimi barvili

Pri ugotavljanju poškodb celične membrane na semenčici in pri določanju deleža živih in mrtvih semenčic v vzorcu semena uporabljamo fluorescentna barvila, kot so Hoechst 33258 (H258) ter kombinacije barvil: propidijev jodid (PI) z karboksifluorescein diacetat (CFDA), ali SYBR-14, ali pa karboksidimetilfluorescein diacetat (CDMFDA) (Juhasz in sod., 2000; Kunc, 2003). Wang in sod. (2005) pa so kot fluorescentno barvilo uporabili karboksifluorescein diacetat sukcinidil ester (CFDA-SE). Barvilo PI je specifično barvilo za DNA, ki lahko vstopi le v poškodovano oz. mrtvo celico. Barvila CFDA, CDMFDA in CFDA-SE pa lahko vstopajo skozi nepoškodovano membrano celic in v prvotni obliki ne fluorescirajo. Šele v notranjosti metabolno aktivnih celic, kjer jih encimi esteraze hidrolizirajo, postanejo ta barvila fluorescentna. Barvanje s kombinacijo dveh barvil razvršča celice v tri kategorije: nepoškodovane oz. žive celice, ki so vidne zeleno zaradi fluorescence hidroliziranih barvil, poškodovane celice, ki so obarvane oranžno zaradi fluorescence obeh barvil (PI in drugo barvilo) ter močno poškodovane oz. mrtve celice obarvane rdeče zaradi fluorescence PI (Juhasz in sod., 2000; Wang in sod., 2005). Tudi barvanje s kombinacijo barvil SYBR-14 in PI ima podoben princip delovanja. SYBR-14, ki lahko vstopa v celico skozi nepoškodovano membrano, se veže na DNA živih celic. PI pa lahko prodre v celico le skozi poškodovano membrano. Tako se žive celice obarvajo zeleno (SYBR-14) in mrtve rdeče (PI) (Eriksson in sod., 2000).



Slika 3: Prikaz semenčic po barvanju s fluorescentnimi barvili, vidnih s pomočjo fluorescentnega mikroskopa (Salkinoja-Salonen, 2006)

Slika na levi prikazuje žive oz. nepoškodovane semenčice, srednja slika rahlo poškodovane in slika na desni mrtve oz. močno poškodovane semenčice.

2.3 CILJI DIPLOMSKEGA DELA

Prvi cilj diplomskega dela je bil izolirati seve bakterije *B. cereus* na osnovi standardnega postopka iz živil in krme. Za kasnejše delo pa smo poleg izoliranih sevov uporabili tudi seve iz že obstoječih zbirk Inštituta za varovanje zdravja in Biotehniške fakultete, Katedre za živilsko mikrobiologijo. Sevom smo določili fenotipske lastnosti. Drugi ključni cilj je bil ugotoviti sposobnost tvorbe različnih toksinov pri izoliranih sevih. Za ugotavljanje prisotnosti enterotoksinov smo uporabili test BCET-RPLA (Oxoid). Za ugotavljanje tvorbe emetičnega toksina pa smo uvedli biometodo na osnovi merjenja zmanjšane gibljivosti merjaščevega semena. Z barvanjem s fluorescentnimi barvili in s testom z resazurinom smo želeli ugotoviti vpliv emetičnega toksina na semenčice.

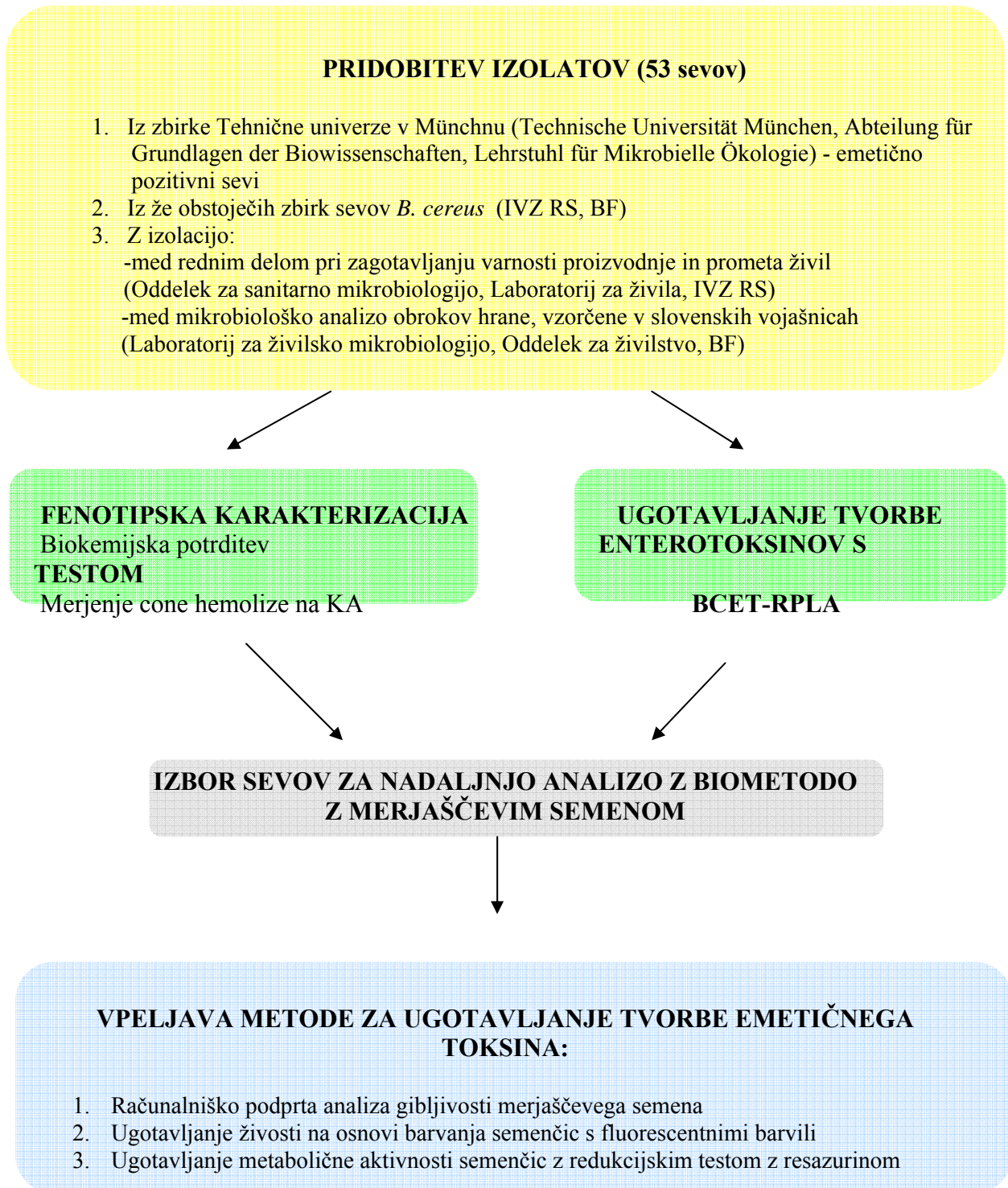
2.4 DELOVNE HIPOTEZE

Predpostavili smo, da:

- Sevi *B. cereus*, izolirani iz živil, tvorijo različne tipe toksinov;
- Obstaja zveza med rutinsko dokazljivimi fenotipskimi lastnostmi sevov in njihovo toksigenostjo (npr. sevi z ozko hemolizo tvorijo cereulid);
- Z biometodo na osnovi zmanjšane gibljivosti merjaščevega semena bomo odkrili emetično pozitivne seve;
- Inkubacija merjaščevega semena z ekstraktom emetično pozitivnih sevov *B. cereus* poleg zmanjšanja gibljivosti povzroči zmanjšanje metabolne aktivnosti in deleža živih semenčic.

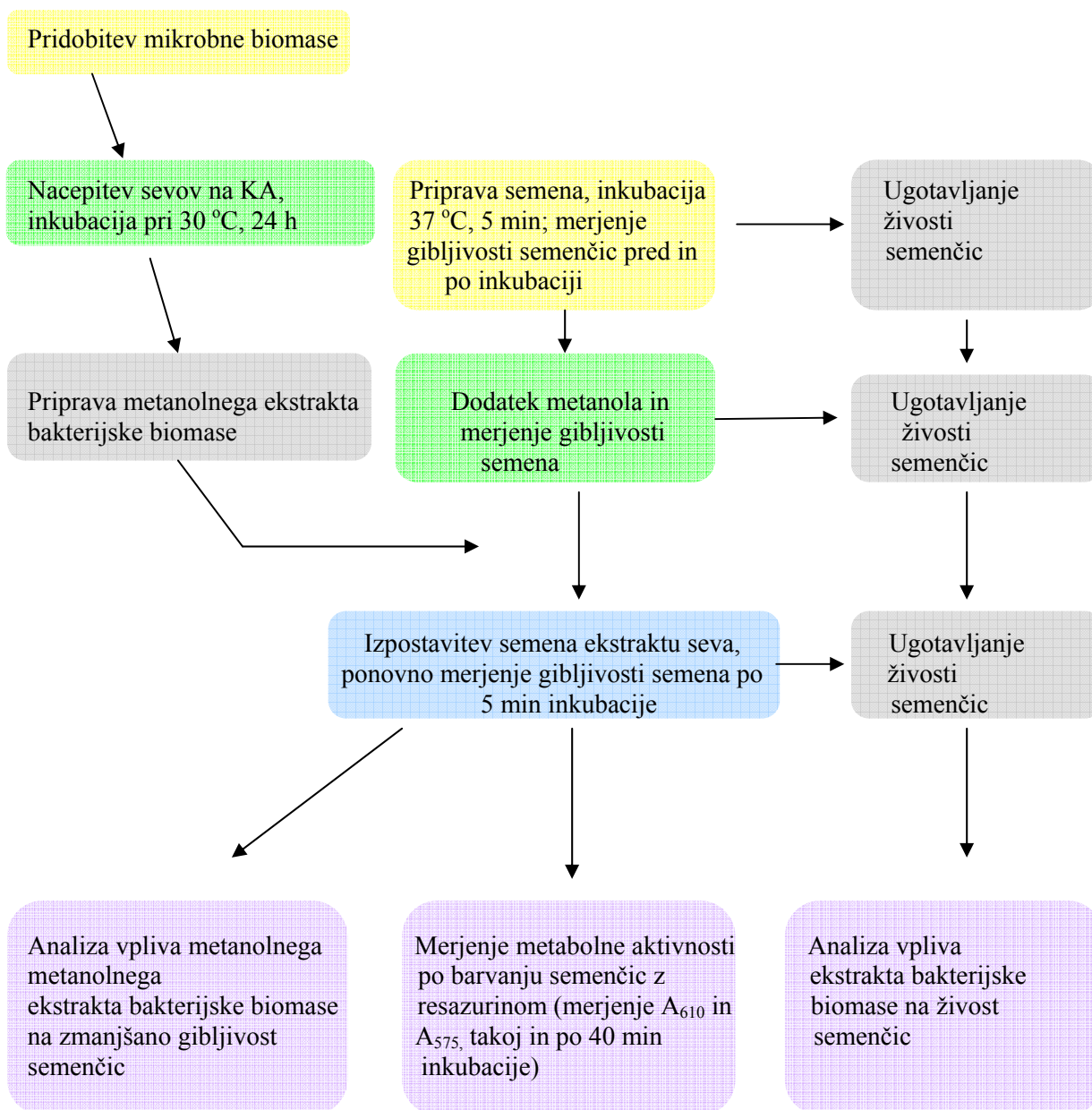
3 MATERIAL IN METODE

3.1 NAČRT EKSPERIMENTA



Slika 4: Prikaz poteka eksperimentalnega dela, opravljenega v okviru diplomske naloge

3.1.1 Eksperimentalni načrt biometode za ugotavljanje tvorbe emetičnega toksina



Slika 5: Načrt biometode za ugotavljanje tvorbe emetičnega toksina z merjaščevim semenom

3.2 MATERIAL

3.2.1 Bakterijski sevi

Pri delu smo uporabljali seve *B. cereus*, ki smo jih dobili iz treh različnih virov:

1. Emetično pozitivni sevi iz zbirke Tehnične univerze v Münchnu (Lehrstuhl für Mikrobielle Ökologie, Abteilung für Grundlagen der Biowissenschaften, Technische Universität München) - so podani v preglednici 2.
2. Sevi iz že obstoječih zbirk sevov *B. cereus* (IVZ RS, BF) so podani v preglednici 3.
3. Izolirani sevi so podani v poglavju Rezultati v preglednici 4.

Preglednica 2: Emetično pozitivni sevi *B. cereus*

Številka seva	Oznaka seva
1	WSBC 10543
2	WSBC 10530
3	WSBC 10549

Preglednica 3 : Sevi *B. cereus* iz trajnih zbirk, ki so bili preiskovani v tem diplomskem delu, z navedbo živila, iz katerega so bili sevi izolirani.

Številka seva	Vrsta živila, iz katerega je bil sev izoliran	Številka seva	Vrsta živila, iz katerega je bil sev izoliran
20	Polnjeni bonboni	37	Vanilij puding
21	Makaronovo meso	38	Zamrznjeni sadni cmok
22	Ravioli s skuto	39	Kremna rezina
23	Zamrznjene jagode	40	Rižota
24	Jajčni melanž	41	Francoska solata
25	Desertni preliv	42	Suhe fige
26	Ajdova moka	43	Otroška prehrana
27	Kremna rezina	44	Šampinjoni v slanici
28	Kajmak	45	Ananas rezine
29	Šobska solata	46	Francoska solata
30	Kosilo za dojenčke	47	Francoska solata
31	Koncentrat za juho	49	Gobice v omaki
32	Kremna rezina	50	Pražen krompir
33	Kremna rezina	51	Dunajska rezina
34	Kajmak	52	Sladoled
35	Stročji fižol	53	Polnjena paprika
36	Kakav		

3.2.2 Mikrobiološka gojišča

Krvni agar:

sestavine	Količina (ml)
Hranljivi agar (Merck, Nemčija)	1000
Defibrirana ovčja, konjska, kunčja ali telečja kri	70

KA se uporablja za dokazovanje hemolitičnih mikroorganizmov.

MEYP agar (mannitol-egg_yolk-polimyxin agar):

sestavine	Količina
Bazni medij (Merck, Nemčija)	43 g
Emulzija jajčnega rumenjaka (50%) (Merck)	100 ml
Raztopina polimiksin B sulfata	20 ml
Demineralizirana voda	900 ml

*Bazni medij je sestavljen iz: govejega ekstrakta, encimsko obdelanega kazeina, D-manitola, NaCl, indikatorja-fenol rdeče, vode in iz agarja.

MYP agar je selektivno gojišče za izolacijo *B. cereus*. Selektivna komponenta je polimiksin B, indikator pa fenol rdeče. Bakterije *B. cereus* ne fermentirajo manitola in zato s pomočjo indikatorja tvorijo rožnate kolonije. Obdane so s posebno cono zaradi kopičenja lecitinaze oz. njenega netopnega produkta.

BHI agar

sestavine	Količina
Demineralizirana voda	900 ml
Hranljivi agar	15
Komercialna mešanica za BHI (Merck, Nemčija)	37

Sestavine komercialne mešanice	Količina g/l
Hranljivi substrat (ekstrakt možganov, srca, peptonov)	27,5
Glukoza	2
Dinatrijev hidrogen fosfat	2,5
Natrijev klorid	5

BHI agar smo uporabljali za izvedbo komercialnega testa BCET-RPLA- za ugotavljanje enterotoksinov.

Glukozni bujon

sestavine	Proizvajalec
Pepton	OXOID, Anglija
Fuksin	FLUKA, USA
Glukoza	Merck, Nemčija

Bujon smo uporabili pri dokazovanju izkoriščanja glukoze z ali brez nastanka plina.

Lecitinazni agar

sestavine	Količina ml
Bazni medij za krvni agar (Merck, Nemčija)	90
Suspenzija rumenjaka	10

Agar smo uporabili pri biokemijskem potrjevanju tvorbe lecitinaze.

VP medij

sestavine	Količina
Komercialna mešanica (Merck, Nemčija)	17 g
Demineralizirana voda	1 l

Komercialna mešanica vsebuje peptone iz mesa, fosfatni pufer in glukoze.

Medij smo uporabili za dokazovanje razgradnje glukoze do acetilmetilkarbinola (acetoin) ob majhni tvorbi kislin. Acetoin se ob dodatku KOH in pod vplivom zraka pretvori v diacetil. Ta tvori rdeč kompleks ob prisotnosti alfa naftola.

Nitratni medij

Je BHI bujon z dodatkom KNO_3 (0,1%). Ta bujon se uporablja za biokemijsko potrditev sevov *B. cereus*. Z njim dokazujemo zmožnost izkoriščanja nitratov.

Stalno gojišče

sestavine	Količina
BHI bujon	3,7 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	0,2 g
Agar agar	1,0 g
Demineralizirana voda	100 g

3.2.3 Raztopine, barvila in ostale kemikalije

Fiziološka raztopina: pH = 7,2

3,4 g KH_2PO_4 (Kemika, Hrvaška) raztopimo v 50 ml destilirane vode, pH uravnavamo z 3M NaOH in dopolni z vodo do 100 ml.

Pufer s pH 7,4

Za izvedbo testa BCET-RPLA

Barvila za gramski preparat

Metil vijolično	Merck, Nemčija
Lugol	Merck, Nemčija
Raztopina za razbarvanje	Merck, Nemčija
Safranin	Merck, Nemčija

Barvila za barvanje merjaščevega semena:

Resazurin (7-Hidroxy-3H-phenoxazin-3-one 10-oxoide) za ugotavljanje metabolne aktivnosti semenčic (Sigma, Steinheim, Germany).

Za fluorescentno barvanje smo uporabili kombinacijo barvil: SYBR-14 in propidijev jodid (PI) (Fertilight Sperm Viability Kit L-7011, Molecular Probes Inc, OR, USA).

Ostale kemikalije:

n-butanol (Merck, Nemčija)
 metanol (Merck, Nemčija)
 imerzijsko olje
 komercialni test BCET-RPLA

3.2.4 Vzorci merjaščevega semena

Vzorci semena so bili dobavljeni sveži iz osemenjevalnega središča Ptuj.

3.2.5 Laboratorijska oprema

Dilumat	AES Laboratoire, Francija
Homogenizator	AES Laboratoire, Francija
Termostat	EHRET, Nemčija
Centrifuga	Sigma, Nemčija CENTRIC 322B, Tehnica, Slovenija
Avtomatske pipete	P100, P1000; Gilson, Francija
Vodna kopel	Gesellschaft Labortechnik, Nemčija
Fluorescentni mikroskop	Olympus BX-40, U-RFL-T, filter 470-490 nm U-MNB Japonska
Mešalnik	Vibromix 114, Tehnica, Slovenija
Spektrofotometer	Lambda 12, UV-VIS Spektrometer, Perkin Elmer, ZDA
Spermoanalizator	(računalniška analiza semena) Hamolton Thore-IVOS 10.6 Hamilton Thore research, MA USA

3.3 METODE

3.3.1 Priprava vzorca živil, izolacija in biokemijska potrditev bakterij *B. cereus*

Vzorci živil smo pripravili v skladu z standardom SIST ISO 6887-1. Najprej smo pripravili osnovno razredčino, tako da smo v sterilno vrečko stekali 20 g vzorca in ga s pomočjo dilumata prelili z 180 ml fiziološke raztopine. Nato smo vzorce homogenizirali v navedenem homogenizatorju. Nadalje smo izvajali postopek v skladu z standardom SIST EN ISO 7932. Iz osnovne razredčine smo po potrebi pripravili še nadaljnje razredčine (odvisno od zahtev standardov za posamezne vrste vzorcev). Nato smo cepili 0,1 ml iz vsake razredčine vzorca od 10^{-1} do 10^{-x} na MEYP agar. Plošče smo inkubirali od 18 do 24 ur pri 30 °C. Morfološko značilne kolonije za *B. cereus* smo precepili na KA in jih ponovno inkubirali od 18 do 24 ur pri 30 °C. Po inkubaciji smo sevom izmerili cono hemolize. Izbrane kolonije smo nato biokemijsko potrdili z nasajanjem bakterij v glukozni agar, VP in nitratni medij ter na lecitinazni agar. Naredili smo tudi gramski preparat.

3.3.2 Revitalizacija sevov *B. cereus* iz stalnih zbirk

Gojišče za shranjevanje sevov smo prelili z bujonom BHI in inkubirali 24 ur pri 30 °C. Nato smo bakterije precepili na KA in ponovno inkubirali 16-24 ur pri 30 °C. Po inkubaciji smo sevom izmerili cono hemolize.

3.3.3 Detekcija enterotoksinov z revezno aglutinacijo lateksa (BCET-RPLA)

Postopek smo izvajali po priloženem navodilu. Izolirane seve smo nacepili na gojišče BHI in ga inkubirali pri 37 °C za 16-18 ur. Nato smo gojišče prelili s 3 ml pufra (pH 7,4), pretresli in vsebino prelili v centrifugirko. Raztopino smo centrifugirali 20 min pri 4 °C in 3000 obratih/min. Potem smo supernatant filtrirali preko 0,2-0,45 µl membranskih filtrov.

Lateks reagenti (TD951, TD952) in diluent (TD954) so bili že pripravljene za uporabo. Potrebno pa jih je bilo nežno pretresti, da smo zagotovili homogeno suspenzijo. Kontrolno suspenzijo za enterotoksin (TD953) smo rekonstruirali tako, da smo dodali 0,5 ml diluenta in nežno mešali, dokler se toksin ni raztopil. Nato smo si pripravili mikrotitersko ploščico tako, da smo imeli dve vrsti po 8 odprtini za en vzorec - filtrat.

Odpipetirali smo 25 µl diluenta v vse odprtine, razen v prvi odprtini v obeh vrstah. Nato smo odpipetirali 25 µl pripravljenega filtrata v prvo in drugo odprtino v obeh vrstah. V drugi odprtini smo premešali diluent in vzorec ter prenesli 25 µl v naslednjo odprtino. To smo ponavljali do predzadnje, sedme odprtine in s tem redčili vzorec. Nato smo odpipetirali 25 µl občutljivega lateks reagenta (TD951) v celo zgornjo vrsto. V spodnjo vrsto pa smo dodali 25 µl kontrolnega lateks reagenta (TD952). Vsebinsko ploščice smo premešali in pazili, da ni prišlo do mešanja vsebine med odprtinami. Ploščice smo spravili v PE vrečke in jih pustili na sobni temperaturi 20-24 ur.

Rezultate smo odčitavali na črni podlagi. Rezultat v zadnji odprtini prve vrste in v vseh odprtinah v drugi vrsti je moral biti negativen, drugače smo postopek ponovili.

3.3.4 Izbor sevov za nadaljnje poizkuse ugotavljanja tvorbe cereulida z merjaščevim semenom

Emetično pozitivni sevi tvorijo na KA zelo šibko cono hemolize (Ehling-Schulz in sod., 2005; Pirhonen in sod., 2005) in ne tvorijo hemoliotičnih enterotoksinov (Pirhonen in sod., 2005).

Po merjenju hemolize sevov na KA in po izvedbi testa za enterotoksine smo za nadaljnji poizkus z biometodo z merjaščevim semenom izbrali seve, ki bi najverjetneje lahko tvorili emetični toksin - cereulid. Zato smo izbrali seve, ki so imeli cono hemolize ožjo od 2 mm oz. 2 mm in hkrati niso tvorili enterotoksinov.

3.3.5 Ugotavljanje tvorbe emetičnega toksina z merjaščevim semenom

Shematično so uporabljene metode predstavljene na sliki 5 na strani 22.

Pred vsakim poizkusom smo v treh ponovitvah izmerili gostoto vsakega uporabljenega merjaščevega semena s spektrofotometrom in izračunali povprečno vrednost gostote semena.

Poizkuse, opisane pod točkami 3.3.5.1, 3.3.5.2 in 3.3.5.3, smo za vzorce 5, 8, 15, 16, 17 in 18 ponovili z isto vrsto merjaščevega semena, ki smo ga izbrali na podlagi rezultatov predhodnih poizkusov. To seme je kazalo najmanjšo občutljivost na dodatek metanola.

3.3.5.1 Ugotavljanje zmanjšane gibljivosti merjaščevega semena pod vplivom metabolnega ekstrakta bakterijske biomase

Najprej smo nacepili seve na KA in jih inkubirali pri 30 °C več kot 16 ur oz. dokler ni bila vidna hemoliza na agarju. Nato smo pripravili ekstrakt bakterij v metanolu. V 2 ml metanola smo suspendirali od 150-200 mg biomase. Ekstrakt smo pripravili v plastičnih centrifugirkah, ki se zaprejo z zavojem. Nato smo ekstrakt v dobro zaprtih centrifugirkah kuhali v vreli vodi 10-15 min in ga po kuhanju ohladili pod mrzlo vodo. Sledila je analiza čistega vzorca merjaščevega semena. Najprej smo seme inkubirali 5 min v vodni kopeli na 37 °C in mu določili s pomočjo spermoanalizatorja odstotek gibljivosti. Nato smo 1 ml semena dodali 0,05 ml metanolnega ekstrakta bakterijske biomase (koncentracija ekstrakta ne sme biti višja od 5%), premešali in po 5 min smo zopet merili odstotek gibljivosti istega semena.

Negativna kontrola: namesto ekstrakta smo uporabili metanol.

Pozitivna kontrola: za pripravo ekstrakta smo uporabili emetično pozitivne seve: WSBC 10530, WSBC 10543, WSBC 10549.

3.3.5.2 Barvanje semena s fluorescentnimi barvili za ugotavljanje živosti semenčic

Uporabili smo kombinacijo barvil SYBR-14 in propidijev jodid (PI).

Vzorci semena, ki smo jih analizirali:

- čisti vzorci merjaščevega semena
- vzorci semena z dodatkom topila metanola
- vzorci semena z dodanim metanolnim ekstraktom bakterijske biomase

Vzorci za analizo smo pripravili tako, da smo v 1 ml vzorca semena dodali 5 μ l raztopine SYBR-14 in 5 μ l PI. Vzorec smo nato inkubirali v vodni kopeli pri 37 °C 10 min. Po končani inkubaciji smo naredili razmaz na stekelce in ga posušili na zraku. V eni uri po pripravi razmaza smo vzorce pregledali pod fluorescentnim mikroskopom.

Enak postopek smo ponovili za vse vzorce semena (ista vrsta semena je bilo uporabljena trikrat: 1. čisto seme, 2. z dodatkom metanola in 3. z dodatkom metanolnega ekstrakta bakterijske biomase). Vsakič smo prešteli trikrat po sto semenčic za vsak vzorec semena (na različnih mestih razmaza) in za nadaljnjo analizo rezultatov upoštevali povprečni delež 300 analiziranih semenčic. Semenčice brez poškodb plazemske membrane, obarvane s SYBR-14, so se obarvale zeleno. Semenčice s poškodbo membrane so se obarvale s PI rdeče. Zeleno obarvane semenčice smo ocenili za nepoškodovane oz. žive in rdeče obarvane semenčice za močno poškodovane oz. mrtve.

3.3.5.3 Postopek redukcijskega testa z resazurinom za ugotavljanje metabolične aktivnosti semenčic

Seme smo pred izvedbo testa inkubirali 10 min na 37 °C v vodni kopeli. V epruvete smo odpipetirali po 3 ml vzorca semena, razredčenega s komercialnim razredčevalcem v razmerju 1:1 in mu dodali 30 μ l 1,8 mM resazurina v fiziološki raztopini ter dobro premešali. Raztopino semena in resazurina smo inkubirali različen čas v vodni kopeli pri 37 °C. Prvi čas inkubacije je bil nič- torej smo absorbanco izmerili takoj po dodatku resazurina, drugi čas inkubacije pa je bil 40 min. Po končani inkubaciji smo odvzeli 1 ml raztopine in jo dodali k 1,5 ml n-butanola. Dobljeno reakcijsko zmes smo centrifugirali pri 3000 rpm 10 min pri sobni temperaturi. Nato smo izmerili absorbanco v dobljenem supernatantu (butanolna frakcija ekstrakcije) pri valovnih dolžinah 610 nm in 575 nm. Pri 610 nm ima maksimalno vrednost absorbance resazurin in pri 575 nm ima maksimalno vrednot absorbance reduciran resazurin – resorufin.

Tudi tu smo enak postopek ponovili za vse vzorce semena (ista vrsta semena je bila uporabljena trikrat: 1. čisto seme, 2. z dodatkom metanola in 3. z dodatkom metanolnega ekstrakta bakterijske biomase).

3.3.7 Statistična analiza

V poizkusu zbrane podatke smo pripravili in uredili s programom EXCEL XP. Tako urejene podatke smo statistično obdelali z računalniškim programom SAS (SAS Software, Version 8.01, 1999) s proceduro GLM (General Linear Models).

Statistični model za parametre merjaščevih semenčic pri ugotavljanju prisotnosti emetičnega toksina v preiskovanih ekstraktih izolatov je vključeval vpliv dodatka (D) (model 1) v postopku ugotavljanja vpliva toksina:

$$y_{ij} = \mu + D_i + e_{ij}$$

kjer je y_{ij} = ij-to opazovanje, μ = povprečna vrednost, D_i – vpliv dodatka (kontrolna skupina ob začetnem času in po 5 minutah, dodatek metanola in dodatek metanolnega ekstrakta bakterijske biomase) in e_{ij} = ostanek.

Statistični model za analizo rezultatov merjenja absorpcije po barvanju z resazurinom je vključeval vpliv dodatka (D) in časa meritve (M) (model 2).

$$y_{ijk} = \mu + D_i + M_j + S \cdot M_{ij} + e_{ijk}$$

kjer je y_{ijk} = ijk-to opazovanje, μ = povprečna vrednost, D_i – vpliv dodatka (kontrolna skupina, dodatek metanola in dodatek metanolnega ekstrakta bakterijske biomase); M_j – vpliv meritve absorpcije (0 s in 40 s), $D \cdot M_{ij}$ – interakcija i-tega dodatka in j-tega časa meritve in e_{ijk} = ostanek.

Srednje vrednosti za eksperimentalne skupine so bile izračunane z uporabo Duncan procedure in so primerjane pri 5 % tveganju. Pearsonovi korelacijski koeficienti med opazovanimi parametri semena so izračunani z uporabo CORR procedure.

Vse poizkuse pri ugotavljanju emetičnega toksina z merjaščevim semenom smo izvajali v paralelkah in za rezultat podali povprečne vrednosti izmerjenih meritev. Pri fluorescentnem barvanju semenčic smo za vsak vzorec prešteli trikrat po 100 semenčic, ki so bile obarvane rdeče ali zeleno in od tega izračunali povprečni delež živih oz. mrtvih semenčic. Pri redukcijskem testu z resazurinom pa smo za vsak vzorec pripravili 4 paralelke in izmerili njihove absorbance (pri 610 nm in 575 nm) ter izračunali povprečne vrednosti za obe absorbanci.

4 REZULTATI

4.1 IZOLACIJA IN BIOKEMIJSKA POTRDITEV BAKTERIJ *B. cereus* IZ VZORCEV ŽIVIL IN NEKATERIH OKOLJSKIH VZORCEV

V eksperimentalni del diplome je bilo vključeno 130 vzorcev različnih živil, ki so predstavljala rizične skupine živil za okužbo z bakterijo *B. cereus* in tudi vzorec okoljekompost. Po standardnih postopkih in priporočenih metodah smo iz živil izolirali različne seve bakterije *B. cereus*. Osnovna merila za prepoznavanje kolonij vrste *B. cereus* na uporabljenih gojiščih (MEYP in KA) so bila njihova morfologija, tvorba netopnega precipitata diacilglicerola zaradi lecitinazne aktivnosti in rožnata barva kolonij zaradi nezmožnosti razgradnje manitola. Posamične od naštetih lastnosti so značilne tudi za druge bakterijske vrste iz rodu *Bacillus*. To dejstvo zahteva uporabo najmanj dveh vrst agarja za fenotipsko identifikacijo bakterij *B. cereus*. Seve, ki so bili izolirani iz živila, katero je vsebovalo število bakterij *B. cereus*, večje kot 100 cfu/g in so imeli sevi tipične lastnosti za *B. cereus*, smo še dodatno potrdili z anaerobno razgradnjo glukoze, s testom Voges-Proskaver, nacepljanjem sevov na lecitinazni agar in nitratni medij ter z mikroskopiranjem gramskih preparatov. Rezultati biokemijske potrditve sevov *B. cereus*, ki smo jih uporabili za kasnejše eksperimentalno delo, so vidni v preglednici 4.

Zbirko izoliranih sevov smo še povečali z že obstoječimi zbirkami teh bakterij na BF, Katedri za živilsko mikrobiologijo in IVZ RS, Oddelku za sanitarno mikrobiologijo. Ti sevi so bili prav tako izolirani po enakem postopku iz različnih živil. Sevi iz že obstoječih zbirk so bili biokemijsko potrjeni pred shranjevanjem in imajo enake rezultate biokemijskih testov kot izolirani sevi v preglednici 4.



Slika 6: Prikaz tipičnih kolonij bakterij *B. cereus* na selektivnem gojišču MEYP

4.2 CONA HEMOLIZE IN TVORBA ENTEROTOKSINOV ANALIZIRANIH SEVOV *B. cereus*

Vsem sevom smo izmerili velikost hemolize na KA. S komercialnim testom BCET- RPLA pa smo jim določili zmožnost oz. nezmožnost tvorbe enterotoksinov. Velikost cone hemolize in rezultat testa BCET- RPLA za seve, izolirane iz živil, so podani v preglednici 4, za seve iz že obstoječih zbirk pa v preglednici 5.

Preglednica 4: Sevi, izolirani na osnovi standardnega postopka izolacije iz živil in okoljskih vzorcev ter njihove fenotipske značilnosti

Številka seva	Vrsta živila, iz katerega je bil sev izoliran	Biokemijska potrditev				Velikost cone hemolize (mm)	Tvorba enterotoksinov
		ferment. glukoze	VP	redukcija nitratov	gramski preparat		
4	Telečja obara	+	+	+	G+ bacili	4	da
5	Kuhane testenine	+	+	+	G+ bacili	<1	ne
6	Govedina v solati	+	+	+	G+ bacili	3	ne
7	Skutin zavitek	+	+	+	G+ bacili	<1	da
8	Bazilika	+	+	+	G+ bacili	1	ne
9	Mlet črni poper	+	+	+	G+ bacili	6	da
10	Mlet črni poper	+	+	+	G+ bacili	4	da
11	Paniran fižol	+	+	+	G+ bacili	3	da
12	Paniran fižol	+	+	+	G+ bacili	2	da
13	Stročji fižol	+	+	+	G+ bacili	3	da
14	Desertno pecivo	+	+	+	G+ bacili	4	da
15	Kajmak	+	+	+	G+ bacili	<1	ne
16	Tatarski biftek	+	+	+	G+ bacili	2	ne
17	Rižota	+	+	+	G+ bacili	1	ne
18	Rižev narastek	+	+	+	G+ bacili	1	ne
19	Kompost	+	+	+	G+ bacili	0,5	ne

Iz 15 živil smo izolirali bakterije *B. cereus* v številu, večjem od 100 cfu/g živila. Od teh živil so bila tri škrobno bogata živila (testenine, rižota in rižev narastek), tri začimbe (dva mleta črna popra in bazilika), tri jedi iz stročnic (dva panirana in stročji fižol), ena juha (obara), eno desertno pecivo in dva namaza (tatarski biftek, kajmak). V eksperimentu pa smo vključili tudi sev *B. cereus*, izoliran iz komposta. Ker najdemo bakterije vrste *B. cereus* v zelo raznolikih ekoloških nišah, smo v našem delu izbrali različne skupine živil in tudi našli bakterije te vrste v široki paleti jedi.

Sevi, izolirani iz živil, ki smo jih uporabili za kasnejše eksperimentalno delo, so bili G+ bacili, ki so fermentirali glukozo, reducirali nitrate in imeli pozitivno reakcijo VP. Od šestnajstih izoliranih sevov, ki so bili biokemijsko potrjeni kot *B. cereus*, jih je 8 tvorilo enterotoksine. Sevov z ozko cono hemolize (2 mm in manj) je bilo 9. Sevov, ki niso tvorili enterotoksinov in so imeli hkrati še ozko cono hemolize pa je bilo 7.

Od triintridesetih sevov, ki smo jih revitalizirali iz trajnih zbirk, jih je 18 tvorilo enterotoksine. Sevov z ozko cono hemolize (2 mm in manj) je bilo le 6.

Sevov, ki ne tvorijo enterotoksinov in imajo hkrati še ozko cono hemolize je bilo 5. Široka cona hemolize je bila do pred kratkim ena od najvažnejših kriterijev za potrditev tipičnih sevov *B. cereus*. To je tudi razlog, da je med sevi, ki smo jih revitalizirali iz trajnih zbirk tako malo sevov z ozko cono hemolize.

Vseh sevov (izoliranih in revitaliziranih iz trajnih zbirk), ki smo jih vključili v merjenje cone hemolize in ugotavljanje sposobnosti tvorbe enterotoksinov je bilo 49. Izmed teh jih je 26 tvorilo enterotoksine. Delež sevov, ki so tvorili hemolitični enterotoksin, je znašal torej 53 %. Delež sevov, ki niso tvorili enterotoksinov pa je bilo 23, torej 47 %. Sevov z ozko cono hemolize je bilo 14. Ta delež predstavlja le 29 % od vseh razpoložljivih sevov. Sevov, ki so imeli ozko cono hemolize in zraven niso tvorili enterotoksinov, je bilo 12. To je 24 % od vseh sevov. Hkrati pa ti sevi predstavljajo kar 86 % sevov z ozko hemolizo. Te seve smo vključili v nadaljnje eksperimentalno delo – ugotavljanje tvorbe emetičnega toksina na osnovi analiz merjaščevega semena, ki smo ga izpostavili metanolnemu ekstraktu bakterijske biomase, ki je predvidoma vseboval cereulid. Le en sev je tvoril enterotoksine in imel hkrati ozko cono hemolize, kar predstavlja 2 % od vseh razpoložljivih sevov.

Preglednica 5: Izvor, cona hemolize in sposobnost tvorbe enterotoksinov sevov, ki so bili shranjeni v stalnih zbirkah

Št. seva	Vrsta živila, iz katerega je bil sev izoliran	Velikost cone hemolize (mm)	Tvorba enterotoksinov
20	Polnjeni bonboni	3,5	da
21	Makaronovo meso	3	da
22	Ravioli s skuto	3	da
23	Zamrznjene jagode	3	da
24	Jajčni melanž	2,5	da
25	Desertni preliv	2	ne
26	Ajdova moka	1	ne
27	Kremna rezina	4	da
28	Kajmak	2	ne
29	Šobska solata	3	da
30	Kosilo za dojenčke	4	ne
31	Koncentrat za govejo juho	3	ne
32	Kremna rezina	2	ne
33	Kremna rezina	4	da
34	Kajmak	4	da
35	Stročji fižol	1,5	ne
36	Kakav	3	ne
37	Vanilij puding	3	ne
38	Zamrznjeni sadni cmok	3,5	ne
39	Kremna rezina	3	ne
40	Rižota	3	da
41	Francoska solata	4	ne
42	Suhe fige	2	da
43	Otroška prehrana	2,5	ne
44	Šampinjoni v slanici	3	ne
45	Ananas rezine	3,5	da
46	Francoska solata	3	da
47	Francoska solata	4	ne
49	Gobice v omaki	3	da
50	Pražen krompir	3	da
51	Dunajska rezina	4	da
52	Sladoled	3	da
53	Polnjena paprika	5	da

4.3 IZBOR SEVOV ZA NADALJNI POIZKUS Z BIOMETODO Z MERJAŠČEVIM SEMENOM

Po merjenju hemolize sevov na KA in po izvedbi testa za enterotoksine smo izbrali seve, ki bi najverjetneje lahko tvorili emetični toksin - cereulid. Izbrali smo seve, ki so imeli cono hemolize široko največ 2 mm, in hkrati niso tvorili enterotoksinov.

Tako smo za nadaljnji poizkus izbrali seve z oznakami: 5, 8, 15, 16, 17, 18, 19, 26, 28 in 35. Seveda pa smo kot pozitivno kontrolo uporabili vse tri seve, ki dokazano tvorijo emetični toksin (sev 1, sev 2 in sev 3).

4.3.1 Lastnosti sevov, ki dokazano tvorijo emetični toksin - cereulid

Prav tako smo izmerili velikost cone hemolize na KA sevom, ki dokazano tvorijo emetični toksin cereulid. Preverili smo tudi tvorbo enterotoksinov.

Preglednica 6: Prikaz velikosti cone hemolize na KA in tvorbe enterotoksinov za seve, ki dokazano tvorijo emetični toksin

Številka seva	Velikost cone hemolize (mm)	Tvorba enterotoksinov
1	1,5	ne
2	1	ne
3	0,5	ne

Vsi trije sevi, ki so sposobni tvorbe emetičnega toksina – cereulida, so imeli ozko cono hemolize na KA. Prav tako tudi nobeden med njimi ni tvoril enterotoksinov.

4.4 REZULTATI MERJENJA ZMANJŠANE GIBLJIVOSTI MERJAŠČEVEGA SEMENA POD VPLIVOM METANOLNEGA EKSTRAKTA BAKTERIJSKE BIOMASE

4.4.1 Vpliv kakovosti semena na izvedbo poizkusov

Za izvedbo poizkusov z merjaščevim semenom smo dobivali vsak dan sveže merjaščevo seme različnih plemenskih merjascev iz osemenjevalnega centra Ptuj. V prvi seriji poizkusov smo uporabljali semena 24 različnih merjascev, ki so se med seboj razlikovali, zato smo vzorcem merjaščevega semena izmerili naslednje karakteristike:

Gostota semena

Gostoto semena smo izmerili spektrofotometrično. Njena vrednost se je gibala med 78,7 in $240,3 \times 10^6$ semenčic/ml razredčenega semena.

Začetna giblјivost semenčic

Povprečno giblјivost smo izmerili v vzorcu, ki je bil inkubiran pri 37 °C na začetku poizkusa in po 5 minutni inkubaciji z računalniško podprto analizo giblјivosti. Ugotovili smo, da se je giblјivost semenčic v različnih vzorcih semena po 5 minutni inkubaciji zelo močno razlikovala in se je gibala od 0 do 79 %, kar kaže na zelo različno kakovost merjaščevega semena.

Giblјivost semenčic po dodatku metanola

Po dodatku metanola je bilo v vzorcih semena giblјivih le še od 0 do 23 % semenčic. Močan padec giblјivosti je bil povezan s slabo giblјivostjo oz. kakovostjo semena, izmerjeno že pred dodatkom metanola. Praviloma je veljalo, da je seme s slabo začetno giblјivostjo po dodatku metanola še dodatno izgubilo delež giblјivih semenčic.

Živost semenčic pred izvedbo poizkusa

Živost semenčic, ki smo ga pred izvedbo poizkusa določili z barvanjem s fluorescentnimi barvili, je znašala od 59,7 do 95,7 %, kar je prav tako kazalo na zelo različno kakovost semena, ki smo ga dobili za analizo.

Ker na kakovost dobavljenega semena nismo imeli vpliva in smo seme potrebovali za ugotavljanje relativnega zmanjšanja giblјivosti, živosti in metabolne aktivnosti, smo prvo serijo poizkusov izpeljali z različnimi vzorci semena, kljub njihovi slabi kakovosti. Želeli smo ugotoviti osnovne vplive na izvedbo poizkusov in narediti predizbor potencialno emetičnih sevov *B. cereus*, kar nam je tudi uspelo. V drugi seriji poizkusov pa smo uporabili seme standardizirane kakovosti, poleg tega pa zmanjšali koncentracijo metanola v ekstraktu, saj topilo močno zavira giblјivost semenčic.

4.4.1.1 Vpliv metanola na gibljivost in živost semenčic

V preglednicah 7 in 8 so zbrani rezultati statistične obdelave meritev gostote, gibljivosti in živosti semenčic v uporabljenih vzorcih merjaščevega semena pred izvedbo poizkusov (preglednica 7) in med izvedbo (pred in po 5 min inkubaciji, po dodatku metanola in metanolnega ekstrakta bakterij (preglednica 8). Iz preglednice 8 je razvidno, da statistično značilno zmanjšanje gibljivosti in živosti semenčic povzroči že dodatek metanola, zato smo v nadaljnjih poizkusih zmanjšali koncentracijo metanola v testni raztopini za 50 %, poleg tega pa smo poizkuse izpeljali s standardiziranim, kakovostnim semenom.

Preglednica 7: Rezultati meritev lastnosti merjaščeveh semenčic z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri pred izvedbo poizkusov

merjaščevo seme	n	\bar{x}	min	max	so	KV (%)
Gostota	192	135,6	78,7	240,3	41,79	30,82
gibljivost (%)	96	28,9	0	79,0	21,21	109,90
mrtvi (%)	96	10,4	4,3	40,3	5,13	49,20
živi (%)	96	89,6	59,7	95,7	5,13	5,73

n - število obravnavanj; \bar{x} - povprečna vrednost; min - minimalna vrednost; max - maksimalna vrednost; so - standardni odklon; KV (%) - koeficient variabilnosti.

Preglednica 8: Razlike v opazovanih parametrih merjaščeveh semenčic med eksperimentalnimi skupinami (model 1, Duncanov test, $P=0,05$): pred in po dodatku metanola oz. metanolnega ekstrakta bakterijske biomase

merjaščevo seme	kontrola	kontrola 5 min	dodatek metanola	dodatek metanolnega ekstrakta bakt. biomase	značilnost vpliva dodatka (P-vrednost)
gostota	135,6±42,1 ^a	135,6±42,1 ^a	135,6±42,1 ^a	129,3±48,3 ^a	0,9802
gibljivost(%)	28,9±22,8 ^a	34,9±21,7 ^a	8,3±8,5 ^b	5,3±12,0 ^b	<0,0001
mrtvi (%)	8,2±3,0 ^b	7,5±2,3 ^b	11,9±3,8 ^a	14,9±8,9 ^a	<0,0001
živi (%)	91,8±3,0 ^a	92,5±2,3 ^a	88,2±3,8 ^b	85,1±8,9 ^b	<0,0001

$P \leq 0,001$ statistično zelo visoko značilna razlika; $P \leq 0,01$ statistično visoko značilna razlika; $P \leq 0,05$ statistično značilna razlika; $P > 0,05$ statistično neznačilna razlika; ^a^b povprečja z enako črko v vrstici se med seboj statistično značilno ne razlikujejo.

4.4.1.2 Vpliv metanola in metanolnega ekstrakta bakterijske biomase na metabolično aktivnost semenčic

Z redukcijskim testom z resazurinom smo merili metabolično aktivnost semenčic za 24 neodvisnih vzorcev. Za vsak vzorec smo pripravili 4 enake paralelke in izmerili njihove absorbance (610 nm in 575 nm) pri obeh časih ter izračunali povprečno vrednosti A_{610} in A_{575} .

Preglednica 9: Vpliv dodatka metanola oz. metanolnega ekstrakta bakterijske biomase na absorbanco po barvanju semenčic z resazurinom v odvisnosti od časa meritve

absorbanca	čas meritve (min)	kontrola	metanol	metanolni ekstrakt bakt. biomase	P-vrednost
A_{610}	0	$0,158 \pm 0,064^{xa}$	$0,149 \pm 0,043^{xa}$	$0,166 \pm 0,080^{xa}$	$P_D < 0,0001$ $P_M < 0,0001$ $P_{D*M} < 0,0381$
	40	$0,106 \pm 0,052^{yb}$	$0,117 \pm 0,040^{yb}$	$0,140 \pm 0,038^{xa}$	
A_{575}	0	$0,091 \pm 0,039^{yb}$	$0,096 \pm 0,038^{yb}$	$0,110 \pm 0,046^{ya}$	$P_D < 0,0001$ $P_M < 0,0001$ $P_{D*M} < 0,0055$
	40	$0,147 \pm 0,057^{xa}$	$0,130 \pm 0,048^{xb}$	$0,139 \pm 0,029^{xab}$	

$P \leq 0,001$ statistično zelo visoko značilna razlika; $P \leq 0,01$ statistično visoko značilna razlika; $P \leq 0,05$ statistično značilna razlika; $P > 0,05$ statistično neznačilna razlika; ^{xy} skupini z enako črko v stolpcu se med seboj statistično značilno ne razlikujeta; ^{abc} povprečja z enako črko v vrstici se med seboj statistično značilno ne razlikujejo.

V preglednici 9 so zbrani rezultati statistične obdelave meritev metabolične aktivnosti semenčic z redukcijskim testom z resazurinom. Test smo izvajali z merjenjem absorbanc pri 610 nm, kjer ima maksimalno vrednost absorbance resazurin, in pri 575 nm, kjer ima maksimalno vrednost absorbance reduciran resazurin – resorufin. V preglednici 9 je razvidno, da je razlika absorbanc pri 610 nm med časom 0 in 40 min statistično značilna pri kontroli semena in po dodatku metanola, pri dodatku metanolnega ekstrakta bakterijske biomase pa ni statistično značilne razlike. Absorbanca pri 610 nm se med kontrolami semena in pri dodatku metanola statistično ni razlikovala, vendar pa se pokaže statistična razlika pri dodatku metanolnega ekstrakta bakterijske biomase. Zelo podobno situacijo potrjujejo povprečne vrednosti absorbanc pri 575 nm, ki kažejo, da je resorufin nastajal statistično značilno hitreje, če je bil semenu dodan le metanol in ne metanolni ekstrakt bakterijske biomase, ki je vseboval emetični toksin. S tem smo potrdili, da bakterijski ekstrakt z emetičnim toksinom zmanjšuje metabolično aktivnost semenčic. Ti rezultati kažejo, da je redukcijski test z resazurinom, kljub slabi kakovosti semena, potekal uspešno in ga v nadaljnjih poizkusih nismo spreminjali.

4.4.2 Rezultati poizkusa z 2,5 % metanolnim ekstraktom in s standardiziranim vzorcem semena

4.4.2.1 Gibljivost semena

Preglednica 10: Prikaz gibljivosti merjaščevega semena za negativno kontrolo poizkusa

Merjaščevo seme	Čas inkubacije semena (min)	Povprečna gibljivost semena (%)
Kontrola semena 1	0	75
Kontrola semena 2	5	77
Metanol	5	83

Za negativno kontrolo poizkusa smo direktno izmerili gibljivost semena - brez predhodne inkubacije semena (kontrola semena 1) in dobili 75 % gibljivost semenčic. Nato smo izmerili gibljivost istemu vzorcu semena po 5 minutni inkubaciji na 37 °C (kontrola semena 2) in dobili 77 % gibljivost. Istemu vzorcu semena smo nato dodali takšen volumen metanola, da smo dobili 2,5 % raztopino le-tega in ji izmerili gibljivost, ki je v povprečju znašala 83 %.

Iz teh meritev smo lahko povzeli dvoje:

- Visok odstotek gibljivih semenčic pred in po 5 – minutni začetni inkubaciji je potrjeval zelo kakovostno seme;
- Visok odstotek gibljivih semenčic je bil ohranjen tudi po dodatku topila (metanola), kar pomeni, da smo uspešno znižali delež topila v testni raztopini.

Preglednica 11: Prikaz gibljivosti merjaščevega semena po izpostavitvi metanolnemu ekstraktu emetično pozitivnih sevov *B. cereus*: pozitivna kontrola poizkusa

Oznaka seva	Čas izpostavitve semena ekstraktu (min)	Povprečna gibljivost pred dodatkom ekstrakta (%)	Povprečna gibljivost semena po dodanem ekstraktu (%)
1	5	78	32
2	5	78	23
3	5	78	21

Za pozitivno kontrolo poizkusa smo uporabili ekstrakte sevov, ki dokazano tvorijo cereulid. Vzorcem semena smo dodali enak volumen ekstrakta, kot prej čistega metanola (tako, da smo dobili 2,5 % raztopino) in nato izmerili gibljivost semenčic. Gibljivost vzorca semena po dodatku metanolnega ekstrakta bakterijskega seva 1 je po 5 minutah inkubacije znašala le 32 %, vzorca semena po dodatku metanolnega ekstrakta bakterijskega seva 2 le 23 %. Gibljivost vzorca semena po dodatku metanolnega ekstrakta bakterijskega seva 3 je bila najmanjša, 21 %.

Iz teh poizkusov smo zaključili, da bo primerljivo zmanjšanje gibljivosti semenčic po dodatku metanolnih ekstraktov preiskovanih sevov *B. cereus* pokazatelj tvorbe cereulida.

V nadaljnje poizkuse smo vključili šest sevov, ki so v predhodnih eksperimentih pokazali največji vpliv na gibljivost merjaščevega semena. To so bili sevi števil 5, 8, 15, 16, 17 in 18. Vsi so bili izolirani iz živil v okviru eksperimentalnega dela te diplomske naloge.

Preglednica 12: Prikaz gibljivosti semena po izpostavitvi metanolnemu ekstraktu izbranih izolatov *B. cereus* iz živil

Oznaka vzorca	Izvor seva	Čas izpostavitve semena ekstraktu (min)	Povprečna gibljivost pred dodatkom ekstrakta (%)	Povprečna gibljivost semena po dodanem ekstraktu (%)
5	Kuhane testenine	5	78	17
8	Bazilika	5	78	61
15	Kajmak	5	78	71
16	Tatarski biftek	5	78	57
17	Rižota	5	78	39
18	Rižev narastek	5	78	73

Povprečna gibljivost semena, ki smo mu dodali ekstrakt izbranega bakterijskega seva, je po petih minutah inkubacije je znašala za vzorec 5 le 17 %. Gibljivost za vzorec 8 je bila 61 %, za vzorec 15 71 %, za vzorec 16 57 %, za vzorec 17 je bila gibljivost 39 % in za vzorec 18 je bila kar 73 %. Iz teh rezultatov smo sklepali, da je le metanolni ekstrakt bakterijske biomase, ki je zmanjšal gibljivost semenčic iz 78 % na 17 %, vseboval emetični toksin. To je bil metanolni ekstrakt seva 5, ki je bil izoliran iz kuhanih testenin. To pa je tip živila, iz katerega je izolacija emetično pozitivnih sevov najpogostejša tudi po objavljenih virih.

4.4.2.2 Rezultati barvanja semenčic s fluorescentnimi barvili po izpostavitvi semena metanolnemu ekstraktu

Poleg zmanjšane gibljivosti smo mikroskopsko spremljali tudi poškodovanost celične membrane semenčic oz. razlike v deležu živih in mrtvih semenčic, ki so se s fluorescentnima barviloma SYBR-14 in propidijevim jodidom obarvale zeleno oz. rdeče.

Preglednica 13: Prikaz povprečnih deležev močno poškodovanih (mrtvih) in nepoškodovanih (živih) semenčic v vzorcu merjaščevega semena, izpostavljenega topilu (metanolu) in metanolnemu ekstraktu izbranih izolatov *B. cereus*

Oznaka vzorca	Povprečni delež mrtvih oz. močno poškodovanih semenčic (%)	Povprečni delež živih oz. nepoškodovanih semenčic (%)
Metanol	4,3	95,7
sev 1	5,3	94,7
sev 2	8,0	92,0
sev 3	8,7	91,3
sev 5	22,3	77,7
sev 8	10,3	89,7
sev 15	5,0	95,0
sev 16	6,0	94,0
sev 17	8,0	92,0
sev 18	3,3	96,7

V prvi seriji poizkusov, v katere je bilo vključenih 24 različnih vzorcev merjaščevega semena, smo ugotovili, da ima dodatek metanola vpliv na delež živih semenčic (preglednica 8, str. 37), zato smo koncentracijo metanola zmanjšali za 50 %. Tako je bil delež mrtvih oz. poškodovanih semenčic po dodatku metanola v drugi seriji poizkusov 4,3 %, po dodatku metanolnega ekstrakta bakterijske biomase pa med 3,3 in 22,3 %. Za kontrolne emetično pozitivne seve je delež mrtvih semenčic po izpostavitvi znašal med 5,7 in 8,7 %. Največjo spremembo živosti je povzročil vzorec številka 5, ki smo ga že zaradi zmanjšane gibljivosti označili za emetično pozitiven izolat. Res pa je, da je bil ta vzorec semena pod mikroskopom zelo neenoten. V določenem polju je bil odstotek rdeče obarvanih semenčic (mrtvih) le 6 % in v drugem polju 10 %. V tretjem polju pa je bil odstotek zelo visok, 51 %. To je verjetno posledica slabega mešanja semena med dodatkom metanolnega ekstrakta bakterijskega seva 5.

4.4.2.3 Rezultati redukcijskega testa z resazurinom kot merila metabolične aktivnosti semenčic

Vsi rezultati redukcijskega testa z resazurinom v drugem delu eksperimenta so občutno nižji od rezultatov redukcijskega testa z resazurinom prvega dela eksperimenta (z različnimi vzorci semena). V obeh delih smo izvajali test po enakem postopku, edina razlika je bila uporabljena pipeta za doziranje barvil in samo seme, ki je imelo nižjo gostoto kot večina semen uporabljenih v prvem delu eksperimenta. Gostota semena v drugi seriji poizkusov je znašala 100×10^6 semenčic/ml semena. Vrednost absorbance in tudi pretvorba dodanega resazurina pa je odvisna tudi od gostote semena. Glede na to, da so bile vse izmerjene vrednosti v drugem delu eksperimenta enakega velikostnega razreda, menimo, da so rezultati kljub temu smiselni.

Preglednica 14: Povprečne vrednosti izmerjene absorbance pri valovni dolžini 610 nm in 575 nm pred in po 40-minutni inkubaciji merjaščevega semena- za negativno kontrolo redukcijskega testa z resazurinom

Oznaka vzorca	čas inkubacije semena (min)	A ₆₁₀	A ₅₇₅
Kontrola semena	0	0,040±0,005	0,017±0,003
	40	0,022±0,010	0,049±0,017
Alkohol	0	0,040±0,006	0,022±0,008
	40	0,020±0,007	0,032±0,008

Pri kontroli semena je absorbanca pri 610 nm v času 40 min padla iz 0,040 na 0,022 (torej za 0,018). Absorbanca pri 575 nm pa je v istem času narasla za 0,032. Po dodatku metanola pa je A₆₁₀ v 40 min padla za 0,020 in A₅₇₅ narasla za 0,010. Ti rezultati kažejo, da dodatek topila metanola ne zavira metabolizma semenčic.

Preglednica 15: Povprečne vrednosti izmerjene absorbance pri valovni dolžini 610 nm in 575 nm pred in po 40-minutni inkubaciji merjaščevega semena z ekstraktom emetično pozitivnih sevov *B. cereus* - za pozitivno kontrolo testa

Oznaka vzorca	čas inkubacije semena z ekstraktom (min)	A ₆₁₀	A ₅₇₅
1	0	0,038±0,009	0,014±0,005
	40	0,030±0,010	0,020±0,005
2	0	0,095±0,025	0,037±0,015
	40	0,080±0,008	0,038±0,019
3	0	0,031±0,015	0,042±0,020
	40	0,035±0,012	0,035±0,013

Za pozitivno kontrolo tega testa smo zopet uporabili ekstrakt sevov, ki dokazano tvorijo emetični toksin. Pri vzorcu semena, ki smo mu dodali metanolni ekstrakt seva 1, se je A₆₁₀ zmanjšala po 40 minutni inkubaciji za 0,008. A₅₇₅ pa je v istem času narasla le za 0,006. Pri

vzorcju semena, ki smo mu dodali metanolni ekstrakt seva 2, so razlike med obema A_{610} in med obema A_{575} še manjše. A_{610} se zmanjša le za 0,005, A_{575} pa se poveča le za 0,001. Podobno je tudi pri vzorcju semena, ki smo mu dodali metanolni ekstrakt seva 3. S primerjavo teh rezultatov z negativno kontrolo redukcijskega testa z resazurinom vidimo, da se semenčicam, izpostavljenim cereulidu zmanjša metabolična aktivnost. Razlika A_{610} med časom 0 in 40 min pri semenu, ki je bil izpostavljen ekstraktu izbranega emetično pozitivnega seva, je bila pri semenu, izpostavljenemu sevu 2 in 3, nižja od razlike negativne kontrole. Za seme, ki je bil izpostavljen ekstraktu seva 1 pa je razlika A_{610} med časom 0 in 40 min enaka kot pri kontroli semena, vendar pa A_{575} skoraj ni narasel, kar pomeni da ni nastajal resorufin. A_{575} med časom nič in 40 min se tudi pri ostalih dveh vzorcih ni dvignila.

Zaključili smo, da bo zmanjšanje A_{610} in zvišanje A_{575} v butanolni frakciji ekstrakcije semenčic, ki smo jim dodali metanolni ekstrakt preiskovanih sevov *B. cereus*, dodatna potrditev tvorbe cereulida, če bo imelo seme po izpostavitvi ekstraktu preiskovanih sevov značilno zmanjšano gibljivost.

Preglednica 16: Povprečne vrednosti izmerjene absorbance pri valovni dolžini 610 nm in 575 nm pred in po 40-minutni inkubaciji merjaščevega semena z ekstraktom izbranih izolatov *B. cereus*

Oznaka vzorca	čas inkubacije semena z ekstraktom (min)	A_{610}	A_{575}
5	0	0,083±0,030	0,070±0,024
	40	0,058±0,015	0,044±0,019
8	0	0,044±0,005	0,008±0,003
	40	0,027±0,010	0,024±0,007
15	0	0,070±0,002	0,004±0,002
	40	0,034±0,007	0,025±0,006
16	0	0,036±0,012	0,015±0,007
	40	0,036±0,003	0,036±0,015
17	0	0,055±0,020	0,013±0,006
	40	0,046±0,017	0,032±0,015
18	0	0,075±0,031	0,015±0,007
	40	0,041±0,018	0,079±0,030

Iz preglednice 16 je razvidno, da A_{610} pri vseh vzorcih po 40 minutni inkubaciji semena z ekstraktom rahlo pada, A_{575} pa je pri vseh vzorcih razen pri vzorcju številka 5 narasla. Razlike med izmerjenimi vrednostmi so zelo majhne, zato iz teh rezultatov ne moremo potrditi tvorbe cereulida za noben preiskovani sev. Prav tako pa za večino vzorcev tudi gibljivost ni bila zmanjšana. Edini vzorec semena, ki je imel tipično zmanjšanje gibljivosti semenčic je bil izpostavljen sevu številka 5. To pa je tudi edini vzorec, ki v tem primeru ni povzročil povečane A_{575} , kar pomeni, da resorufin ni nastajal, najverjetneje zaradi vpliva bakterijskega ekstrakta. Seveda pa bi morali predvideno tvorbo emetičnega toksina potrditi s tekočinsko kromatografijo.

5 RAZPRAVA

5.1 IZOLACIJA IN BIOKEMIJSKA POTRDITEV BAKTERIJ *B. cereus* IZ VZORCEV ŽIVIL IN NEKATERIH OKOLJSKIH VZORCEV

Bakterije vrste *B. cereus* najdemo v zelo raznolikih ekoloških nišah (From in sod., 2005; Pirhonen in sod., 2005; Todar's Online Textbook of Bacteriology, 2005). Pirhonen in sod. (2005) menijo, da je *B. cereus* najpogosteje izolirana bakterija, ki lahko povzroči zastrupitev s hrano. Največkrat je bila ta bakterija izolirana v hrani bogati s škrobom, ki je bila toplotno obdelana in tudi v sveži hrani, kot je npr. zelenjava (Rosenquist in sod., 2005).

Z našimi rezultati izolacije lahko potrdimo, da so bakterije vrste *B. cereus* v živilstvu zelo široko razširjene. Živila, iz katerih smo izolirali seve *B. cereus* in jih tudi biokemijsko potrdili, so bila po prevzemu v laboratorij na IVZ RS, Oddelku za sanitarno mikrobiologijo in tudi na BF, Katedri za živilsko mikrobiologijo, izbrana kot rizična živila za okužbo z bakterijami te vrste. Tako smo npr. izolirali *B. cereus* iz začimb, kot sta črni mleti poper in mleta bazilika. Leuschner (2003) omenja začimbe kot živilo, ki je pogosto kontaminirano z bakterijo *B. cereus* v visokem številu. Prav tako smo izolirali bakterijo *B. cereus* iz kremnih slaščic, ki jih Rosenquist in sod. (2005) uvrščajo med živila, ki so bila visoko kontaminirana. Prav tako so Rosenquist in sod. (2005) dobili visoko število *B. cereus* najpogosteje v sladica z mlekom in rižem. Sem lahko uvrstimo tudi rižev narastek, iz katerega smo tudi izolirali bakterijo *B. cereus*. Med najpogosteje kontaminirano hrano z *B. cereus* pa uvrščajo toplotno obdelana škrobna živila, npr. riž in testenine (Rosenquist in sod., 2005; Finlay in sod., 2002; Pirhonen in sod., 2005). Mi smo izolirali *B. cereus* iz šestih škrobnih živil. V tabeli 5 in tabeli 6 so to sevi z oznakami 5, 17, 18, 21, 22 in 40. Pirhonen in sod. (2005) omenjajo makarone z mletim mesom kot živilo, ki je že povzročilo zastrupitev- emetični in diarejni tip zastrupitve. Mi smo izolirali sev 21 (tabela 6) iz tega živila. Shaheen in sod. (2006) menijo, da je uprašena hrana za dojenčke (mlečne formule) močno kontaminirana z bakterijo *B. cereus* in kontaminacija naj bi se še povečevala. Bakterijo *B. cereus* smo izolirali iz dveh otroških pripravkov (sev 30 in sev 43 v preglednici 6).

5.2 CONA HEMOLIZE IN TVORBA ENTEROTOKSINOV ANALIZIRANIH SEVOV *B. cereus*

Vsem sevom, katerim smo potrdili vse značilne lastnosti za *B. cereus*, smo po 24-urni inkubaciji na 30 °C izmerili velikost cone hemolize. Tako kot Andersson in sod. (2004) ter Pirhonen in sod. (2005) smo označili cono hemolize za ozko cono, če je bila manjša oz. enaka 2 mm. Ostale velikosti cone hemolize pa smo v našem delu označili za široke, medtem ko so Andersson in sod. (2004) razdelili cone hemolize nekoliko podrobneje. Imeli so še cono, večjo od 2 mm in široko cono hemolize, katera je bila v tem primeru večja od 4 mm.

Preiskovali smo 49 izoliranih sevov (preglednici 4 in 5). Od teh ima ozko cono hemolize 14 sevov (5, 7, 8, 12, 15, 16, 17, 18, 19, 25, 26, 28, 32, 35 in 42 v tabeli 4 in 5). To pa predstavlja 29 % vseh preiskovanih sevov. Široko cono hemolize ima torej 35 sevov (vsi ostali sevi v preglednicah 4 in 5), kar predstavlja 71 %. Andersson in sod. (2004) so preiskovali 222 sevov *B. cereus*, ki so jih zbrali iz različnih zbirk in živil. Določili so 107 sevov z ozko cono hemolize, kar znaša 48 %. To je precej višji delež. Pirhonen in sod. (2005) pa so preiskovali seve *B. cereus* izolirane iz ene same jedi - makaronov z mletim mesom. Dobili pa so kar 70 % sevov z ozko cono hemolize. Široka cona hemolize je bila do pred kratkim ena od najvažnejših kriterijev za potrditev tipičnih sevov *B. cereus*. Predvidevamo, da je to glavni razlog, da je med revitaliziranimi sevi (preglednica 5) tako malo sevov z ozko cono hemolize.

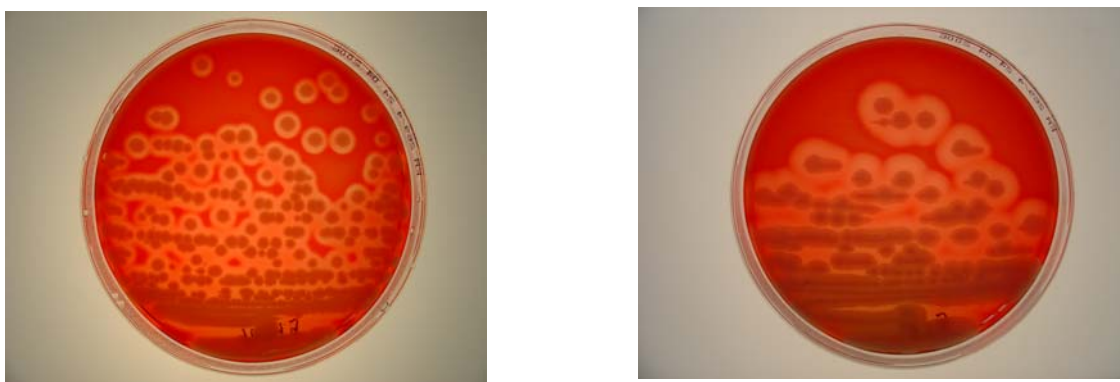
Vidimo, da je cona hemolize zelo raznolika med sevi *B. cereus*, ki so bili inkubirani pod enakimi pogoji in je odvisna predvsem od vrste seva bakterije. Mnogi (Ehling-Schulz in sod., 2005a; Andersson in sod., 2004; Pirhonen in sod., 2005) omenjajo cono hemolize na KA kot kriterij za ločevanje med emetičnimi in neemetičnimi sevi. Svensson in sod. (2005) so mnenja, da bi bilo za rutinske preiskave živil merjenje cone hemolize na KA primeren test za ločevanje emetičnih od neemetičnih sevov. Priporočajo pa primerjavo cono hemolize z referenčnimi sevi.

Vsem 49- im preiskovanim sevom *B. cereus* smo poleg velikosti cone hemolize ugotavljali tudi zmožnost tvorbe hemolitičnega enterotoksina z imunološko encimsko metodo BCET-RPLA. S to metodo lahko določimo prisotnost L₂ komponente hemolitičnega enterotoksina (Hbl). Delež sevov *B. cereus*, za katere je bil test BCET-RPLA pozitiven in imajo na podlagi teh rezultatov zmožnost tvorbe Hbl enterotoksina, je 53%. Tudi Ehling-Schulz in sod. (2005a), ki so preiskovali seve, izolirane iz različnih živil, so dobili enak delež *B. cereus*, ki so sposobni tvoriti Hbl enterotoksin. V tej preiskavi pa so določali enterotoksine s pomnoževanjem genov, ki nosijo zapis za tvorbo različnih enterotoksinov. Pomnožke so obdelali z restrikcijскими encimi in izpeljali elektroforezo. To pa daje enakemu rezultatu še večji pomen. Tudi Prüss in sod. (1999) so dobili delež sevov, ki tvorijo Hbl enterotoksin okoli 50 %. Godič Torkar in Smole Možina (2000) sta s testom BCET-RPLA in pomnoževanjem fragmenta Hbl ugotavljali sposobnost tvorbe enterotoksina pri 82 izolatih *B. cereus* iz mleka in mlečnih izdelkov in jo z obema metodama potrdili pri 66 (80,5 %) izolatih in z 97,5 % ujemanjem rezultata encimsko-immunske in molekularne-genetske metode. Pirhonen in sod. (2005), ki so preiskovali samo seve izolirane iz makaronov z mletim mesom, ki so bili vzrok zastrupitve, so dobili nizek delež sevov, ki so sposobni tvorbe Hbl enterotoksina, le 26 %.

Ti rezultati prikazujejo, da je sposobnost tvorbe diarealnega enterotoksina (Hbl) močno razširjen med bakterijami *B. cereus*. Tvorba tega toksina pa je odvisna od tipa seva bakterije in tudi od okolja, kjer bakterija raste.

5.3 IZBOR SEVOV ZA NADALJNI POIZKUS Z BIOMETODO Z MERJAŠČEVIM SEMENOM

Fenotipska in genotipska analiza zelo raznolike zbirke sevov *B.cereus* je pokazala precejšno raznovrstnost sevov, ki tvorijo enterotoksine. Sevi, ki tvorijo emetični toksin cereulid, pa so si fenotipsko in genotipsko precej podobni med seboj. Ti sevi niso zmožni razgradnje škroba, niti fermentacije salicina. Poleg tega ne vsebujejo gena, ki kodira zapis za produkcijo hemolizina BL (Hbl) in zato imajo ti sevi na krvnem agarju zelo šibko cono hemolize. Nasprotno pa so hemolitično-enterotoksigeni sevi *B.cereus* zelo raznoliki in se razvrščajo v različne skupine, če so uporabljeni različni tipi analiz (Ehling-Schultz in sod., 2005a; Pirhonen in sod., 2005; Andersson in sod., 2004)



Slika 7: Primerjava cone hemolize med emetično pozitivnim sevom in sevom izoliranim iz živil, ki ni tvoril emetičnega toksina

Slika na levi prikazuje ozko cono hemolize emetično pozitivnega seva bakterij *B. cereus*. Slika na desni pa prikazuje sev *B. cereus*, ki smo ga izolirali iz živila in ima široko cono hemolize. Pri poizkusih z biometodo z merjaščevim semenom pa sev ni kazal lastnosti emetično pozitivnih sevov.

Predpostavili smo, da sevi *B. cereus*, izolirani iz živil, sintetizirajo različne tipe toksinov. Na podlagi podatka, da sevi, kateri tvorijo Hbl enterotoksin, ne tvorijo emetičnega toksina cereulida (Ehling-Schultz in sod., 2005b; Pirhonen in sod., 2005; Andersson in sod., 2004) smo te seve izključili iz nadaljnje preiskave. Naslednji kriterij pa je bila tudi velikost cone hemolize. Emetično pozitivni sevi naj ne bi imeli cone hemolize, širše od 2 mm (Ehling-Schultz in sod., 2005a; Pirhonen in sod., 2005; Andersson in sod., 2004; Svensson in sod., 2005). To pa smo tudi potrdili z emetično pozitivnimi sevi, ki smo jih uporabili za pozitivno kontrolo nadaljnega poizkusa z merjaščevim semenom (preglednica 6).

Za nadaljnji poizkus z biometodo z merjaščevim semenom smo izbrali seve, ki bi lahko bili emetično pozitivni. To so bili sevi s cono hemolize do 2 mm, hkrati pa niso tvorili diarealnega enterotoksina Hbl. Tako smo izbrali seve iz preglednic 4 in 5 z oznakami: 5, 8, 15, 16, 17, 18, 19, 26, 28.

5.4 REZULTATI MERJENJA ZMANJŠANE GIBLJIVOSTI MERJAŠČEVEGA SEMENA POD VPLIVOM METANOLNEGA EKSTRAKTA BAKTERIJSKE BIOMASE

5.4.1 Vpliv kakovosti semena na izvedbo poizkusov

Pri izvedbi biometode za dokazovanje emetičnega toksina na osnovi zmanjšane gibljivosti merjaščevega semena je bilo do sedaj uporabljeno le standardizirano merjaščevo seme in sicer z gostoto 27×10^6 semenčic/ml razredčenega semena (Andersson in sod., 2004; Hoorstra in sod., 2003; Jääskeläinen in sod., 2003; Häggblom in sod. 2002; Pirhonen in sod., 2005) ali pa z gostoto 30×10^6 semenčic/ml razredčenega semena in z začetno gibljivostjo, večjo od 80 % (Rajkovic in sod., 2006). V našem delu pa smo v prvi seriji poizkusov uporabili različne vzorce semena, katerim smo merili različne karakteristike. Te so se med vzorci semena razlikovale in s tem tudi kakovost semena (preglednica 7). Skozi potek poizkusov smo ugotovili, da je za izvedbo biometode za dokazovanje emetičnega toksina na osnovi zmanjšane gibljivosti merjaščevega semena med najpomembnejšimi dejavniki začetna gibljivost semena in sicer pred in po dodatku metanola. Prav zato smo v drugi seriji poizkusov uporabili standardizirano seme, ki je imelo začetno gibljivost semena po 5- minutni inkubaciji 77 % in po dodatku metanola in 5 minutni inkubaciji na 37 °C 83 % gibljivost semenčic.

5.4.1.1 Vpliv metanola na gibljivost in živost semenčic

Rajkovic in sod. (2006) so preiskovali vpliv različnih topil na gibljivost merjaščevega semena in ugotovili, da ima metanol precejšen vpliv na gibljivost semenčic. To lahko z našimi rezultati, dobljenimi v prvi seriji poizkusov (koncentracija metanola je bila 5 %) tudi potrdimo. Poleg zmanjšane gibljivosti semenčic smo zaznali tudi negativen vpliv metanola na živost oz. poškodovanost semenčic (preglednica 8). Delež rdeče obarvanih oz. mrtvih semenčic po dodatku metanola je bil precej večji kot pri samem vzorcu semena, zato smo koncentracijo metanola v nadaljnjih poskusih zmanjšali za 50 %.

5.4.1.2 Vpliv metanola in metanolnega ekstrakta bakterijske biomase na metabolično aktivnost semena

Metabolično aktivne semenčice povzročijo redukcijo resazurina (7-hydroxy-3H phenoxazin-3-one 10-oxide) v resorufin. Spremembo barve iz modre (resazurin) v rožnato (resorufin) in naprej v belo (dihidroresorfin) lahko ovrednotimo spektrofotometrično (Fuse in sod., 1993). Z našimi rezultati lahko potrdimo, da se je resazurin resnično reducirjal v vzorcih semena brez ali z dodatkom metanola. Semenčice so bile metabolično aktivne, saj je A_{610} statistično značilno padla (preglednica 9). Prav tako lahko z našimi rezultati potrdimo nastajanje resorufina, saj je A_{575} , kjer ima resorufin maksimalno absorbanco, pri kontrolnih vzorcih semena in tudi po dodatku metanola statistično značilno rasla (preglednica 9). Pri izpostavitvi semenčic bakterijskemu ekstraktu pa je razlika v absorbanci po 40-minutni inkubaciji precej manjša (preglednica 9), ali pa je sploh ni (preglednica 15).

5.4.2 Rezultati poizkusa z 2,5 % metanolnim ekstraktom in s standardiziranim vzorcem semena

Na podlagi poizkusov z različnimi vzorci merjaščevega semena, smo ugotovili, da metanol močno vpliva na merjene lastnosti semena. Zato smo koncentracijo semena za polovico zmanjšali in uporabili standardizirano seme.

5.4.2.1 Gibljivost semena

Če je v metanolnem ekstraktu bakterijske biomase prisoten emetični toksin cereulid, je gibljivost semenčic zmanjšana, njihovi mitohondriji pa so poškodovani (Andersson in sod., 2004; Hoornstra in sod., 2003; Jääskeläinen in sod., 2003; Häggblom in sod. 2002; Pirhonen in sod., 2005; Rajkovic in sod. 2006). To smo uspeli potrditi z rezultati merjenja gibljivosti semena izpostavljenega 2,5 % metanolnemu ekstraktu, pripravljenega iz emetično pozitivnih sevov *B. cereus*. Gibljivost semena se je v povprečju zmanjšala za več kot 55 % (preglednica 11).

Biometodo za dokazovanje emetičnega toksina na osnovi zmanjšane gibljivosti merjaščevega semena so izvedli tako, da so merili čas potreben za popolno inhibicijo gibljivosti semena, izpostavljenega metanolnemu ekstraktu pripravljenemu iz emetično pozitivnih sevov *B. cereus* in nato primerjali rezultate z serijami metanolnih ekstraktov, pripravljenih iz neznanih sevov (Andersson in sod., 1998; Hoornstra in sod., 2003). V kasnejših raziskavah pa so, tako kot smo v našem poizkusu naredili mi, merili zmanjšanje gibljivosti semenčic, izpostavljenih metanolnemu ekstraktu za določen čas (Andersson in sod., 2004; Jääskeläinen in sod., 2003; Rajkovic in sod., 2006). Andersson in sod. (2004) so pri kontroli seme izpostavili čistemu metanolu in uporabili le seme, ki je imelo gibljivost, večjo od 60 %. Če je bilo 90 % semenčic negibljivih, je sev, iz katerega je bil pripravljen ekstrakt, veljal za emetično pozitivnega. Rajkovic in sod. (2006) ter Jääskeläinen in sod. (2003) pa so uporabili le seme, ki je imelo po dodatku iste količine metanola vsaj 80 % gibljivost. Tudi mi smo v drugi seriji poizkusov uporabili seme, ki je imelo gibljivost po dodatku metanola v povprečju 78 %. Glede na rezultate gibljivosti semena, izpostavljenega metanolnemu ekstraktu, pripravljenemu iz emetično pozitivnih sevov, smo postavili za mejno vrednost gibljivosti semena 30 %. Če je imelo seme po izpostavitvi metanolnemu ekstraktu gibljivost 30 % ali manj, smo predpostavili, da je sev iz katerega smo pripravili ekstrakt emetično pozitiven. Ta vrednost je nekoliko višja od mejne vrednosti, ki so jo postavili Andersson in sod. (2004). Vendar pa smo mi uporabili 2,5 % metanolni ekstrakt, oni pa 5 %.

Med šestimi iz gotovih jedi in začimb, ki smo jih analizirali v drugi seriji poizkusov z biometodo za dokazovanje emetičnega toksina na osnovi zmanjšane gibljivosti merjaščevega semena, smo ugotovili en sev, katerega ekstrakt je povzročil več kot 55 % zmanjšanje gibljivosti semenčic, torej primerljiv učinek kot referenčni emetično pozitivni sevi. Določili smo torej en emetično pozitiven sev. Izoliran je bil iz kuhanih testenin (preglednica 12). To pa je tudi živilo, v katerem je bilo do sedaj odkrito največ sevov *B. cereus*, ki so tvorili emetični toksin (Shinagawa, 1990; Leuschner, 2003; Granum in Baird-Parker, 2000). Predvideno tvorbo emetičnega toksina bi morali potrditi s tekočinsko kromatografijo.

5.4.2.2 Rezultati barvanja semenčic s fluorescentnimi barvili

Fluorescentna barvila uporabljamo za ugotavljanje poškodb celične membrane in za določanje deleža živih in mrtvih celic. Barvilo PI lahko vstopi v celico le skozi poškodovano celično membrano in po vezavi na DNK (ki zaradi poškodb celice ni več povezana z jedrnimi beljakovinami) fluorescira rdeče. Ostala fluorescentna barvila pa lahko vstopajo v nepoškodovane celice, kjer jih določeni celični encimi razgradijo in nato fluorescirajo z zeleno barvo (Juhasz in sod., 2000; Hoornstra in sod., 2003; Kunc 2003; Wang in sod., 2005).

Hoornstra in sod. (2003) so v raziskavi ugotovili, da mitohondrijski toksini (sem spada tudi cereulid) zmanjšajo gibljivost semenčic z depolarizacijo mitohondrijev, medtem ko ostane celična membrana semenčic pri enaki koncentraciji prisotnega toksina nepoškodovana. Naši rezultati fluorescentnega barvanja semena kažejo, da se je delež mrtvih in živih semenčic, izpostavljenih metanolnemu ekstraktu emetično pozitivnih sevov *B. cereus*, ni razlikoval od deležev mrtvih in živih semenčic v čistem semenu (preglednica 14). Koncentracija cereulida, ki je potrebna za poškodbo celične membrane semenčic, je 100 krat večja od koncentracije, ki ustavi gibljivost semenčic (ta je podana v ng toksina/ml semena) (Hoornstra in sod., 2003). Samo en vzorec semena je imel nekoliko višji delež mrtvih semenčic. Ta vzorec semena pa je bil pod mikroskopom zelo neenoten. V določenem polju je bil odstotek rdeče obarvanih semenčic (mrtvih) le 6 % in v drugem polju 10 %. V tretjem polju pa je bil odstotek zelo visok, 51 %, kar je verjetno posledica slabega mešanja semena med dodatkom metanolnega ekstrakta bakterijskega seva 5. Rezultat bi bilo potrebno potrditi z dodatnimi poskusi.

5.4.2.3 Rezultati redukcijskega testa z resazurinom za ugotavljanje metabolične aktivnosti semenčic

Cereulid poškoduje celične mitohondrije (Mikkola in sod., 1999; Andersson in sod., 1998; Paananen in sod., 2002; Hoornstra in sod., 2003; Andersson in sod., 2004). Sklepamo lahko, da je metabolizem semenčic, ki so bile izpostavljene metanolnemu ekstraktu emetično pozitivnih sevov *B. cereus*, močno okrnjen. V našem delu smo ocenjevali metabolizem semenčic s pomočjo testa z resazurinom, ki se v metabolično aktivnih celicah razgradi v resorufin. Z dobljenimi rezultati predvsem pozitivne kontrole testa (preglednica 16) lahko pokažemo, da je metabolizem semenčic resnično okrnjen, saj so razlike med absorbancami v času nič in po 40 minutni izpostavljenosti metanolnemu ekstraktu zelo majhne. To pa pomeni, da se resazurin ni razgradil in da ni nastajal resorufin.

Razlike med izmerjenimi vrednostmi A_{610} in A_{575} so zelo majhne, zato iz teh rezultatov ne moremo potrditi tvorbe cereulida za noben preiskovani sev. Prav tako pa za večino vzorcev tudi gibljivost ni bila zmanjšana. Edini vzorec semena, ki je imel tipično zmanjšanje gibljivosti semenčic je bil izpostavljen sevu številka 5. To pa je tudi edini vzorec, ki v tem primeru ni povzročil povečane A_{575} , kar pomeni, da resorufin ni nastajal, najverjetneje zaradi vpliva bakterijskega ekstrakta. Predvideno tvorbo emetičnega toksina bi morali potrditi s tekočinsko kromatografijo.

6 SKLEPI

Med 130 analiziranimi vzorci izbranih živil smo bakterije *B. cereus* s tipičnimi fenotipskimi lastnostmi izolirali iz 15 vzorcev živil.

Z metodo BCET-RPLA smo med 15 izolati iz tega diplomskega dela in dodanimi 34 živilskimi izolati iz že obstoječih zbirk ugotovili sposobnost tvorbe diarealnega toksina pri 26 (53 %) sevih.

Za izvedbo biometode za ugotavljanje emetičnega toksina na osnovi zmanjšane gibljivosti merjaščevega semena je potrebno kakovostno seme z visoko začetno gibljivostjo semenčic.

Optimalna koncentracija metanola v testni raztopini ne presega 2,5 %.

Emetično pozitivni sevi so zmanjšali delež gibljivih semenčic za več kot 55 %.

Emetično pozitivni sevi so zmanjšali metabolno aktivnost semenčic.

Vpliv bakterijske biomase emetično pozitivnih sevov *B. cereus* na živost semenčic bi bilo potrebno preučiti z dodatnimi testi.

7 ZAHVALA

Mentorici prof. dr. Sonji Smole Možina se najlepše zahvaljujem za njeno pomoč pri tematski usmeritvi naloge, za odlično strokovno vodstvo in podporo pri samem delu in pisanju naloge ter za natančen in poglobljen pregled teksta.

Zahvaljujem se vodji oddelka za sanitarno mikrobiologijo na Inštitutu za varovanje zdravja dipl. biologinji Tatjani Rupel, ker mi je omogočila delo v laboratoriju za živila na IVZ RS in mi pri delu pomagala ter me podpirala.

Hvala izr. prof. dr. Marjanu Koscu, ki mi je omogočil delo v laboratoriju na Kliniki za reprodukcijo in konje Veterinarske fakultete v Ljubljani in asistentu mag. Janazu Kuncu, ki mi je pri delu zelo strokovno in nesebično pomagal. Za pomoč v laboratoriju se zahvaljujem tudi gospe Mateji Bogataj.

Hvala vsem sodelavcem Biotehniške fakultete, ki so mi kakorkoli pomagali pri delu, še posebej doc. dr. Lei Gašperlin za statistično obdelavo rezultatov diplomskega dela, gospe Ivici Hočevar in gospe Jani Avbelj.

Hvala tudi vsem sodelavcem Inštituta za varovanje zdravja RS za njihovo razumevanje, pomoč in podporo.

Zahvaliti se želim tudi Osemenjevalnemu središču za plemenske merjasce, Zavoda Ptuj, Kmetijsko gospodarske zbornice, ki nam je podaril vzorce semena za raziskavo.

Mami, oči, Miha in prijateljice, hvala za vašo strpnost, razumevanje in podporo, brez vas ne bi zmogla.

8 REFERENCE

- Agata N., Ota M., Yokoyama K. 2002. Production of *Bacillus cereus* emetic toxin (cereulid) in various foods. *International Journal of Food Microbiology*, 73: 23-27
- Agata N., Ohta M., Mori M., Suwan S., Ohtani I. 1994. A novel dodecadepsipeptid, cereulide, isolated from *Bacillus cereus* causes vacuole formation in HEp-2 cells. *FEMS Microbiology Letters*, 121: 31-34
- Agata N., Ohta M., Mori M., Isobe M. 1995. A novel dodecadepsipeptid, cereulide, is an emetic toxin of *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiology Letters*, 129: 17-20
- Andersson M.A., Ronner U., Granum P.E. 1995. What problems does food industry have with the spore-forming pathogenes *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*? *International Journal of Food Microbiology*, 28: 145-55.
- Andersson M.A., Mikkola R., Helin J., Andersson M.C., Salkinoja-Salonen M. 1998. A novel sensitive bioassay for detection of *Bacillus cereus* emetic toxin and related depsipeptide ionophores. *Applied and Environmental Microbiology*, 4: 1338-1343
- Andersson MA, Jaaskelainen EL, Shaheen R, Pirhonen T, Wijnands LM, Salkinoja-Salonen MS. 2004. Sperm bioassay for rapid detection of cereulide-producing *Bacillus cereus* in food and related environments. *International Journal of Food Microbiology*, 94: 175-83
- Bailey C.P., Holy A. 1993. *Bacillus* spore contamination associated with commercial bread manufacture. *Food Microbiology*, 13: 202-206
- Baron E.J., Peterson L.R., Finegold S.M. 1994. Bailey and Scott's diagnostic Microbiology. 9th ed. New York, Mosby – Year – Book: 958 str.
- BCET-RPLA instruction. 2006. Basingstoke, United Kingdom, Oxoid: 1-1
- Beecher D.J., Wong A.C.L. 1994. Identification and analysis of the antigens detected by two commercial *Bacillus cereus* diarrheal enterotoxin immunoassay kits. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 12: 4614-4616
- Bergere J.L. 1992. Spore formation and germination of *Bacillus cereus*: the spore cycle. *Bulletin of the International Dairy Federation*, 275: 23-25
- Daffonchio D., Borin S., Consolandi A., Mora D., Manachini P.L., Sorlini C. 1998. 16S-23S rRNA internal transcribed spacer as molecular markers for species of the 16S rRNA group I of the genus *Bacillus*. *FEMS Microbiology Letters*, 163: 229-236

Duc L.H., Dong T.C., Logan N.A., Sutherland A.D., Taylor J., Cutting S.M. 2005. Cases of emesis associated with bacterial contamination of an infant breakfast cereal product. *International Journal of Food Microbiology*, 102: 245-251

Ehling-Schulz M., Fricker M., Scherer S. 2004a. Identification of emetic toxin producing *Bacillus cereus* strains by a novel molecular assay. *FEMS Microbiology Letters*, 232: 189-95

Ehling-Schulz M., Fricker M., Scherer S. 2004b. *Bacillus cereus*, the causative agent of emetic type of food-borne illness. *Molecular Nutrition and Food Research*, 48: 479-487

Ehling-Schulz M., Svensson B., Guineretiere M.H., Lindbäck T., Anderson M, Schulz A., Fricker M., Christiansson A., Granum P.E., Märtlbauer E., Nguyen-The C., Salkinoja-Salonen M., Scherer S. 2005a. Emetic toxin formation of *Bacillus cereus* is restricted to a single evolutionary lineage of closely related strains. *Microbiology*, 151, 183-197

Ehling-Schulz M, Vukov N, Schulz A, Shaheen R, Andersson M, Martlbauer E, Scherer S. 2005b. Identification and partial characterization of the nonribosomal peptide synthetase gene responsible for cereulide production in emetic *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 105-13.

Eriksson B.M., Rodriguez Martinez H. 2000. Deep-freezing of boar semen in plastic film 'cochettes'. *Journal of Veterinary Medicine*, 47: 89-97

Finlay W.J.J., Logan N.A., Sotherland A.D. 2002 a. *Bacillus cereus* emetic toxin production in cooked rice. *Food Microbiology*, 19: 431-439

Finlay W.J.J., Logan N.A., Sotherland A.D. 2002 b. *Bacillus cereus* emetic toxin production in relation to dissolved oxygen tension and sporulation. *Food Microbiology*, 19: 423-430

Fraser L., Lecewicz M., Strzerek J. 2002. Fluorometric assessments of viability and mitochondrial status of boar spermatozoa following liquid storage. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 5, 85-92

From C., Pukall R., Schumann P., Hormazabal V. 2005. Toxin-producing ability among *Bacillus* spp. outside the *Bacillus cereus* group. *Applied and Environmental Microbiology*, 3: 1178-1183

Fuse H., Okumura M., Kazama T., Katayama T. 1993. Comparison of resazurin test results with various sperm parameters. *Andrologia*, 25: 153-7

Godič Torkar, Karmen, Smole Možina, Sonja. 2000. Differentiation of *Bacillus cereus* isolates from milk and milk products with biochemical, immunological, AP-PCR and PCR-RFLP methods. *Food Technology and Biotechnology*, 38, 2: 135-142.

Godič Torkar K., Smole Možina S. 2001. Determination of *Bacillus cereus* and its toxins from milk and milk products. *Periodicum Biologorum* 2: 169-173

Granum P.E., Lund T. 1997. *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiology Letters*, 157: 223-228

Granum E. P., Nissen H., 1993. Sphingomyelinase is part of the enterotoxin complex produced by *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiology Letters*, 110: 97-100

Granum P.E., Baird-Parker T.C. 2000. *Bacillus* species. V: The microbiological safety and quality of food. Lund B.M., Baird-Parker T.C., Gould G.W. (eds.). Maryland, Aspen Publishers: 1029-1039

Gürtler V., Stanisich V.A. 1996. New approach to typing and identification of bacteria using the 16S – 23S rDNA spacer region. *Microbiology*, 142: 3-6

Holmes J.R., Plunkett T., Pate P., Roper W.L., Alexander W.J. 1981. Emetic food poisoning caused by *Bacillus cereus*. *Archives of Internal Medicine*, 141: 766-767

Hornstra D, Andersson M.A, Mikkola R., Salkinoja-Salonen M.S. 2003. A new method for in vitro detection of microbially produced mitochondrial toxins. *Toxicology in Vitro*, 17: 745-751

Horwood P.F., Burgess G.W., Oakey H.J. 2004. Evidence for non-ribosomal peptide synthetase production of cereulide (the emetic toxin) in *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiology Letters*, 236: 319-324

Huges S., Bartholomew B., Hardy J.C., Kramer J.M. 1988. Potential application of a HEp-2 cell assay in the investigation of *Bacillus cereus* emetic-syndrom food poisoning. *FEMS Microbiology Letters*, 52: 7-12

ISO 7932. Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal method for the enumeration of presumptive *Bacillus cereus*- Colony count technique at 30 °C. 2004: 6 str.

Jääskeläinen E.L., Häggblom M.M., Andersson M.A., Salkinoja-Salonen M.S. 2004. Atmospheric oxygen and other conditions affecting the production of cereulide by *Bacillus cereus* in food. *International Journal of Food Microbiology*, 96: 75-83

Jääskeläinen E.L., Häggblom M.M., Andersson M.A., Vanne L., Salkinoja-Salonen M.S. 2003. Potencial of *Bacillus cereus* for producing an emetic toxin, cereulide, in bakery products: quantitative analysis by chemical and biological methods. *Journal of Food Protection*, 66: 1047-1054

Juhasz J., Nagy P., Kulcsar M., Huszenica G.Y. 2000. Methods for semen and endocrinological evolution of the stallion: a review. *Acta Veterinaria Brno*, 69: 247-259

Kawamura-Sato K., Hiramata Y., Agata N., Ito H., Torii K., Takeno A., Hasegawa T., Shimomura Y., Ohta M. 2005. Quantitative analysis of cereulide, an emetic toxin of *Bacillus cereus*, by using rat liver mitochondria. *Microbiology and Immunology*, 49: 25-30

Kunc J. 2003. Študij vplivov inkubacijskega časa in pakiranja na uspešnost globokega zamrzovanja merjaščevega semena. Magistrsko delo. Ljubljana, Veterinarska Fakulteta, Klinika za reprodukcijo in konje: 15-17

Leonard C., Zekri O., Mahillon J. 1998. Integrated physical and genetic mapping of *Bacillus cereus* and other Gram positive bacteria based on IS231A transposition vectors. *Infection and Immunity*, 66, 5: 2163-2169.

Leuschner R. 2003. *Bacillus*. V: Encyclopedia of food sciences and nutrition. 2nd ed. Caballero B., Trugo L. C., Finglas P.M. (eds.). Amsterdam, Academic Press: 356-371

Lindbäck T., Fagerlund A., Skeil Rolandt M., Granum P.E. 2004. Characterization of *Bacillus cereus* Nhe enterotoxin. *Microbiology*, 150: 3959-3967

Lodish H., Berk A., Matsudaira P., Kaiser C.A., Krieger M., Scott M.P., Zipursky S.L., Darnell J. 2004. *Molecular Cell Biology*. 5th ed. New York, W.H. Freeman and Company: 317 str.

Lund T., De Buyser M.L., Granum P.E. 2000. A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. *Molecular Microbiology*, 38: 254-254

Lund T., Granum P.E. 1997. Comparison of biological effect of the two different enterotoxin complexes isolated from three different strains of *Bacillus cereus*. *Microbiology*, 143: 151-156

McKillip J.L. 2000. Prevalence and expression of enterotoxins in *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp., a literature review. *Antonie van Leeuwenhoek*, 77: 393-399

Meer R.R., Bodyfelt F. W., Griffiths M. W. 1991. Psychotropic *Bacillus* spp. in fluid milk products: A Review. *Journal of Food Protection*, 54, 12: 969-979

Mikkola R., Saris N.E., Grigoriev P.A., Anderson M.A., Salkinoja-Salonen M.S. 1999. Ionophoretic properties and mitochondrial effects of cereulide. *European Journal of Biochemistry*, 263: 112-117

Paananen A., Mikkola R., Sareneva T., Matikainen S., Hess M., Andersson M.A., Julkunen I., Salkinoja-Salonen M.S., Timonen T. 2002. Inhibition of human natural killer cell activity by cereulide, an emetic toxin from *Bacillus cereus*. *Clinical and Experimental Immunology*, 129: 420-428

Pirhonen T.I., Andersson M.A., Jääskeläinen E.L., Salkinoja-Salonen M.S., Honkanen-Buzalski T., Johansson T.M.-L. 2005. Biochemical and toxic diversity of *Bacillus cereus*

in pasta and meat dish associated with a food-poisoning case. *Food Microbiology*, 22: 87-91

Pirttijärvi T.S.M., Andersson M.A., Salkinoja-Salonen M.S. 2000. Properties of *Bacillus cereus* and other bacilli contaminating biomaterial-based industrial process. *International Journal of Food Microbiology*, 60: 231- 239

Prüss B.M., Dietrich R., Nibler B., Märkelbauer, E., Scherer S. 1999. The hemolytical enterotoxin. HBL is broadly distributed among species of the *Bacillus cereus* group. *Applied and Environmental Bacteriology*, 65: 5436- 5442

Rajkovic A., Uyttendaele M., Deley W., Soom A.V., Rijsselaere T., Debevere J. 2006. Dynamics of boar semen motility inhibition as a semi-quantitative measurement of *Bacillus cereus* emetic toxin (Cereulide). *Journal of Microbiological Methods*, 65: 525-534

Rosenquist H., Smidt L., Andersen S.R., Jensen G.B., Wilcks A. 2005. Occurrence and significance of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* in ready-to-eat food. *FEMS Microbiology Letters*, 250: 129-136

Ryu J.H., Beuchat L.R. 2005. Biofilm formation and sporulation by *Bacillus cereus* on a stainless steel surface and subsequent resistance of vegetative cells and spores to chlorine dioxide, and a peroxyacetic acid-based sanitizer. *Journal of Food Protection*, 12: 2614-2622

Salkinoja-Salonen M. 2006. Sperm staining. Helsinki, University of Helsinki, Faculty of Agriculture and Forestry (april 2006)

<http://www.boicenter.helsinki.fi/groups/salkionja/index.htm> (19.4.2006): 1 str.

Schmitt C.K., Meysick K.C., O'Brien A.D. 1999. Bacterial toxins: Friends or foes? (Synopses). *Emerging Infections Diseases*, 2: 224-233

Schoen J.L., Wong A.C.L. 2005. *Bacillus cereus* food poisoning and its toxins. *Journal of Food Protection*, 68: 636-648

Shaheen R., Andersson M.A., Apetroaie C., Schulz A., Ehling-Schulz M., Ollilainen V.M., Salkinoja-Salonen M.S. 2006. Potencial of selected infant food formulas for production of *Bacillus cereus* emetic toxin, cereulid. *International Journal of Food Microbiology*, 107: 287- 294

Shinagawa K. 1990. Analytical methods for *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. *International Journal of Food Microbiology*, 10: 125-141

SIST EN ISO 7932. Splošno navodilo za ugotavljanje števila *Bacillus cereus*- štetje kolonij pri 30 °C. 1998: 9 str.

SIST ISO 6887-1 Priprava vzorcev za preiskovanje ter osnovne in decimalnih razredčin za mikrobiološko preiskavo. 2004 : 11 str.

Smole Možina S. 2004. Odpornost mikroorganizmov v hrani. V: Pomen mikrobiologije in biotehnologije v proizvodnji varnih živil. Raspor P. (ur.) Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 71-81

Smole Možina S., Hočevar Grom A. 2004. Mikrobiološka varnost živil. V: Varnost živil. 22. Bitenčevi živilski dnevi 2004, Radenci 18. in 19. marec. 2004. Gašperlin L., Žlender B. (ur.) Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 29-43

Svensson B., Monthan A., Shaheen R., Andersson M.A., Salkinoja- Salonen M., Christiansson A. 2006. Occurrence of emetic toxin producing *Bacillus cereus* in dairy producing chain. *Internacional Dairy Journal* 16, 7: 740-749

Szabo R.A., Speirs J.I., Akhtar M. 1991. Cell culture detection and conditions for production of a *Bacillus cereus* heat-stable toxin. *Journal of Food Protection*, 54: 272-276

Taylor J.M.W., Sutherland A.D., Aidoo K.E., Logan N.A. 2005. Heat-stable toxin production by strains of *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus simplex* and *Bacillus licheniformis*. *FEMS Microbiology Letters*, 242: 313-317

Te Giffel M.C., Beumer R.R., Leijendekkers S., Rombouts F.M. 1996. Incidence of *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* in foods in Netherlands. *Food Microbiology*, 13: 53-58

Te Giffel M.C., Beumer R.R., Klijn N., Wagendorp A., Rombouts F.M. 1997. Discrimination between *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* using specific DNA probes based on variable regions of 16S rRNA. *FEMS Microbiology Letters*, 146: 47-51

Todar's online textbook of bacteriology. The Genus *Bacillus*. 2005. Wisconsin, Kenneth Todar University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology <http://textbookofbacteriology.net/Bacillus.html> (26.7.2005)

Väisänen O.M., Mwaishumo N.J., Salkinoja- Salonen M.S. 1991. Differentiation of dairy strains of the *Bacillus cereus* group by phage typing, minimum growth temperature, and fatty acid analysis. *Journal of Applied Bacteriology*, 70: 315-324

Wang XQ, Duan XM, Liu LH, Fang YQ, Tan Y. 2005. Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester fluorescent dye for cell labeling. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 37: 379-385.

Zalata A.A., Lammertijn N., Christophe A., Comhaire F.H. 1998. The correlates and alleled biochemical background of the resazurin reduction test in semen. *International Journal of Andrology*, 21: 289-94

Žlender B. 2003. Predgovor. V: Mikrobiologija živil živalskega izvora. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: XI- XI

