

Marek Bartoszewicz^{1*}, Urszula Czyżewska²

¹Zakład Mikrobiologii, Instytut Biologii, Uniwersytet w Białymstoku

²Zakład Cytobiochemii, Instytut Biologii, Uniwersytet w Białymstoku

Wpłynęło w lipcu, zaakceptowano sierpniu 2017 r.

1. Wstęp. 2. Najważniejsze aspekty biologii *B. cereus* sensu lato. 2.1. Wyzwanie pierwsze – spójna taksonomia. 2.2. Wyzwanie drugie – cykle życiowe i interakcje z otoczeniem. 2.3. Wyzwanie trzecie – adaptacja do niskich temperatur. 2.4. Wyzwanie czwarte – toksyny *B. cereus* sensu lato. 3. Podsumowanie

Taxonomy, virulence and life cycles of *Bacillus cereus* sensu lato

Abstract: *Bacillus cereus* sensu lato is a group of several species of Gram-positive sporeformers ubiquitous in nature and showing huge impact on human activities. They are often found in soil, air, plant material, animal tissues and digestive tracts as well as in food products. Their genetic similarities and frequent horizontal gene transfer causes doubts regarding their taxonomy. In addition, their toxicity and psychrotolerance constitute serious problems in the dairy industry, being responsible for food-poisonings and spoilage of cold-stored products. Finally, recent finding indicate that *B. cereus* sensu lato toxicity plays an important role not only in their virulence, but also in social interactions with other bacteria.

1. Introduction. 2. The most important aspects of *B. cereus* sensu lato biology. 2.1. First challenge – coherent taxonomy. 2.2. Second challenge – life cycles and interactions with the environment. 2.3. Third challenge – adaptation to low temperatures. 2.4. Fourth challenge – toxins of *B. cereus* sensu lato. 3. Summary

Słowa kluczowe: cereulidyna, enterotoksyny, psychrotolerancja, taksonomia

Key words: cereulide, enterotoxins, psychrotolerance, taxonomy

1. Wstęp

Grupa *Bacillus cereus* określana także jako *B. cereus* sensu lato obejmuje co najmniej dziewięć gatunków względnie beztlenowych i przetrwalnikujących, Gram-dodatnich bakterii, szeroko rozprzestrzenionych w przyrodzie i wykazujących szeroki wpływ na różne obszary aktywności człowieka. W jej skład wchodzi: (i) *B. cereus* sensu stricto znany z właściwości chorobotwórczych w stosunku do ludzi [66], (ii) *B. thuringiensis* biosyntetyzujący toksyny owadobójcze [68], (iii) psychrotolerancyjny *B. weihenstephanensis* [40], (iv) *B. mycoides* oraz (v) *B. pseudomycoides* charakteryzujące się ryzoidalnym wzrostem na podłożach stałych [32, 52], (vi) *B. anthracis* będący czynnikiem etiologicznym wąglika [48], a także posiadający właściwości probiotyczne *B. toyonensis* [33], termotolerancyjny i cytotoksyczny *B. cytotoxicus* [25] oraz izolowany przede wszystkim z żywności *B. wiedmannii* [47]. Należy podkreślić, że w ostatnich latach pojawiły się też prace wskazujące na zasadność wyróżniania dalszych gatunków w obrębie grupy *Bacillus cereus*, m.in. *B. manliponensis* [34], *B. bingmayongensis* [41] oraz *B. gaemokensis* [35]. Przegląd najważniejszych cech poszczególnych przedstawicieli grupy *B. cereus* dostępny jest w literaturze [6].

B. cereus sensu lato, choć znane od dawna (np. *B. mycoides* opisany został już w 1886 r.), nadal budzą ogromne zainteresowanie z uwagi na ich powszechność, liczne czynniki wirulencji oraz odmienne interakcje z różnymi organizmami. Zwraca się też uwagę na to, iż *B. cereus* sensu lato poprzez skomplikowaną strukturę genetyczną, stanowią interesujący obiekt badań dostarczający użytecznych danych poszerzających naszą wiedzę w zakresie taksonomii i systematyki bakterii.

Na podstawie analiz podobieństwa sekwencji nukleotydowych rybosomalnego RNA oraz wybranych genów metabolizmu podstawowego, a także bazując na wynikach porównania elektroforetycznych wzorów prążków uzyskanych różnorodnymi metodami genotypowania (*ang.* DNA fingerprinting), zaproponowano, aby całą grupę *B. cereus* traktować jako jeden polimorficzny gatunek bakterii [27]. Z kolei dane fenotypowe, analizy stopnia hybrydyzacji genomowego DNA (DDH) oraz odmienne właściwości chorobotwórcze, tak ważne również w ujęciu praktycznym, zdają się sugerować, że mamy do czynienia z odrębnymi gatunkami [40, 52]. Fakt, że liczne cechy typowe dla poszczególnych taksonów są kodowane przez geny plazmidowe, dodatkowo komplikuje taksonomię grupy. Szczep *B. thuringiensis*, który w trakcie replikacji utraciłby plazmid z genami warunkującymi syntezę białek parasporalnych, stałby

* Autor korespondencyjny: Marek Bartoszewicz, Zakład Mikrobiologii, Instytut Biologii, Uniwersytet w Białymstoku, ul. Ciołkowskiego 1J, 15-245 Białystok; tel. 85 738 83 84; e-mail: mbartoszewicz@uwb.edu.pl

się bowiem nieodróżnialny od szczepów *B. cereus* sensu stricto. Nabycie zaś przez *B. cereus* sensu stricto w drodze koniugacji genów *cry* warunkujących wspomnianą syntezę, mogłoby prowadzić do wykształcenia cech charakterystycznych dla *B. thuringiensis*. Należy zatem zadać sobie pytanie czy współczesna koncepcja gatunku bakteryjnego, zakładająca co najmniej 70% podobieństwo DDH, zgodność sekwencji 16S rRNA na poziomie > 97% oraz odmienność fenotypową w zakresie przynajmniej jednej cechy [14, 46], to dobre wyznaczniki gatunkowe, szczególnie w odniesieniu do tak polimorficznych bakterii, jak *B. cereus* sensu lato.

Innym obszarem intensywnych badań nad *B. cereus* sensu stricto i spokrewnionymi bakteriami jest kwestia ich cykli życiowych oraz interakcji pomiędzy biotycznymi składnikami różnorodnych ekosystemów. Dotychczas potwierdzono obecność wspomnianych bakterii między innymi na roślinach oraz w przewodach pokarmowych kręgowców i bezkręgowców, ale brak jednoznacznych dowodów na to czy fakt ten ma charakter mutualistyczny, pasożytniczy czy stanowi zależną od warunków kombinację różnych interakcji. Pomoc w odpowiedzi na to pytanie może przynieść także lepsze zrozumienie powodów, dla których liczne szczepy *B. cereus* sensu lato obdarzone są zdolnością do biosyntezy różnych toksyn, które mogą nie tylko stanowić czynnik ułatwiający kolonizację organizmów gospodarza, ale także mechanizm oddziaływania z innymi mikroorganizmami [60].

Dalsze badania nad *B. cereus* sensu lato pozwolą na lepsze zrozumienie ewolucji bakterii oraz ich interakcji ze środowiskiem ożywionym i nieożywionym. Dlatego celem niniejszej pracy jest przedstawienie i dyskusja wątpliwości dotyczących filogenezy oraz taksonomii, toksyczności a także cykli i środowisk życia *B. cereus* sensu lato w kontekście aktualnych danych literaturowych.

2. Najważniejsze aspekty biologii *B. cereus* sensu lato

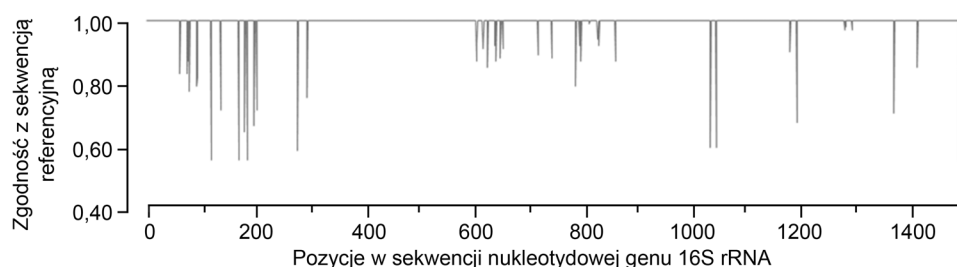
2.1. Wyzwanie pierwsze – spójna taksonomia

Współczesna taksonomia bakterii opiera się na podobieństwie pomiędzy klasyfikowanymi organizmami (taksonomia fenetyczna – bazująca na cechach

fenotypowych) oraz stopniu ich wzajemnego pokrewieństwa (taksonomia filetyczna – odzwierciedlająca stosunki filogenetyczne). Jednak bezpośrednio zastosowanie wyznaczników filo-fenetycznej koncepcji gatunku w odniesieniu do bakterii *B. cereus* sensu lato napotyka na poważne problemy. Już analizy podobieństwa sekwencji nukleotydowej, obecnego zwykle w podobnych 10–15 kopiach genu 16S rRNA wykazały, że *B. cereus* sensu lato różni się tylko nieznacznie wykazując 99,17–100% identyczności ww. sekwencji [1, 3], a sama zmienność ograniczona jest do regionów hiperzmiennych, porozdzielanych obszarami o wysokim stopniu konserwatywności (Rys. 1). Ponadto stwierdzono, że gen 16S rRNA charakteryzuje się wyższą zmiennością u szczepów mezofilnych, podczas gdy u psychrotrofów jest silnie konserwatywny [3], co być może powiązane jest z adaptacją do zachowania zdolności do biosyntezy białek w niższej temperaturze. Przyjęto też, że obecność charakterystycznej sekwencji ¹⁰⁰²TCTAGAGATAGA w obrębie 16S rRNA wskazuje jednoznacznie na *B. weihenstephanensis* [40], jednak późniejsze wyniki nie potwierdziły tego przypuszczenia [3]. Bardziej prawdopodobne, że wspomniany fragment sekwencji typowy jest dla różnych przedstawicieli *B. cereus* sensu lato posiadających taki sam mechanizm adaptacji do chłodu.

W sytuacji, gdy porównywane sekwencje nukleotydowe genu 16S rRNA są identyczne w mniej niż 97%, możemy wyodrębnić odmienne gatunki. Jednak w przypadku różnic nieprzekraczających 3% możemy mieć do czynienia zarówno z odrębnymi gatunkami, jak i jednym tylko taksonem.

Podobieństwo profili elektroforetycznych w zakresie izoenzymów (*ang.* multi-locus enzyme electrophoresis, MLEE) oraz późniejsze badania w oparciu o polimorfizm sekwencji nukleotydowych genów metabolizmu podstawowego (*ang.* multi-locus sequence typing, MLST) także wykazują wysokie pokrewieństwo genetyczne przedstawicieli grupy *B. cereus*. Co więcej, wiarygodna z uwagi na bazowanie na sekwencjach nukleotydowych technika MLST pozwala z jednej strony na podział *B. cereus* sensu lato na typy filogenetyczne, z drugiej strony należy zaznaczyć, że poszczególne typy filogenetyczne grupują często przedstawicieli różnych



Rys. 1. Lokalizacja miejsc konserwatywnych i hiperzmiennych w sekwencji nukleotydowej genu 16S rRNA *B. cereus* sensu lato (Bartoszewicz M., dane niepublikowane)

gatunków. Wspomniany podział za to dobrze odzwierciedla właściwości ekologiczne [6, 26]. W oparciu o te dane należy zatem założyć, że pod wpływem doboru naturalnego, w obrębie *B. cereus* sensu lato uformowały się typy filogenetyczne o różnych zakresach temperatur optymalnych oraz, często, o odmiennej wirulencji. I tak typ I stanowią przede wszystkim szczepy *B. pseudomycooides*, w odniesieniu do których brak jest danych wskazujących na ich wirulencję. Typ II oraz VI obejmuje szczepy psychrotolerancyjne, które łatwo odróżnić na podstawie (typowej wyłącznie dla przedstawicieli typu VI: *B. weihenstephanensis* oraz część szczepów *B. thuringiensis*) sekwencji ⁴ACAGTT w obrębie genu *cspA* [3, 40, 58, 61]. Typ III to bakterie mezofilne o wyraźnym potencjale chorobotwórczym. Należą tu m.in. szczepy *B. anthracis* (m.in. *B. anthracis* Ames) oraz tzw. emetyczne szczepy *B. cereus* sensu stricto wraz z referencyjnym szczepem *B. cereus* sensu stricto F4810/72 (zdolne do wywoływania wymiotnej postaci zatruc pokarmowych) [5, 73]. Typ IV grupuje mezofilne, zwykle komensalne bakterie, m.in. typowy szczep referencyjny *B. cereus* sensu stricto ATCC 14579. Typ filogenetyczny V to umiarkowane pod względem wymagań temperaturowych szczepy spokrewnione z *B. toyonensis*, zaś typ VII obejmuje termotolerancyjne i powiązane z przypadkami ciężkich zatruc pokarmowych szczepy *B. cytotoxicus* [25]. Należy jednak zwrócić uwagę na fakt występowania w różnych typach filogenetycznych przedstawicieli tego samego taksonu. Na przykład *B. cereus* sensu stricto obecny jest m.in. w typach filogenetycznych II, III, IV, natomiast *B. thuringiensis* wśród reprezentantów np. typu III oraz VI [6, 26, 47]. Pozwala to zadać pytanie o sensowność wyróżniania poszczególnych gatunków w sytuacji, gdy taka taksonomia nie odzwierciedla w pełni filogenezy *B. cereus* sensu lato.

Poza MLST, także sekwencjonowanie niektórych pojedynczych genów, m.in. *gyrB* [8] lub plejotropowego regulatora ekspresji genów toksyn *plcR* oraz analizy AFLP (*ang.* amplified fragment length polymorphism) dostarczyło kolejnych ciekawych danych dotyczących pokrewieństwa genetycznego oraz struktury populacji *B. cereus* sensu lato. Nie pozwoliły one jednak na wypracowanie spójnego systemu taksonomicznego dla całej grupy. Choć w mocy pozostaje, stanowiący złoty standard, warunek by poziom hybrydyzacji DNA-DNA wynosił co najmniej 70%, to także ta metoda zawodzi w różnicowaniu np. *B. cereus* sensu stricto i *B. thuringiensis*. Nowym i wygodniejszym odpowiednikiem tej metody jest tzw. cyfrowa hybrydyzacja DNA-DNA (*ang.* digital DNA-DNA hybridization; dDDH) oparta na metodzie obliczania dystansu genetycznego w oparciu o zestawienia całych genomów (*ang.* genome-blast distance phylogeny; GBDP), której wyniki przeliczane są za pomocą odpowiedniego algorytmu na procent

dDDH [2]. Choć i to ujęcie nie zapewnia skutecznego odróżniania wielu przedstawicieli grupy, to z uwagi na porównanie całego genomu daje lepszy wgląd w powiązania filogenetyczne i pozwala szybko i skutecznie weryfikować słuszność wyróżniania nowych gatunków. To właśnie aplikacja tej metody doprowadziła do zaproponowania w ostatnich latach *B. gaemokensis* czy *B. manliponensis* jako nowych przedstawicieli grupy [34–35]. Liu i wsp. [42] wskazują na obecność co najmniej 19–20 nieopisanych jeszcze gatunków w obrębie *B. cereus* sensu lato. Z drugiej strony autorzy ci postulują także, aby *B. weihenstephanensis* oraz *B. mycooides* połączyć w jeden gatunek z uwagi na wysokie, ponad 78% podobieństwo dDDH pomiędzy nimi.

Kolejnym poważnym zarzutem dotyczącym spójności aktualnej taksonomii *B. cereus* sensu lato są, wykorzystywane w identyfikacji przedstawicieli grupy, cechy kodowane plazmidowo. I tak *B. anthracis*, poza opornością na penicylinę i brakiem ruchliwości, tworzy także nietypową, zbudowaną z kwasu D-glutaminowego, otoczkę chroniącą tą bakterię przed fagocytozą oraz syntetyzuje toksynę bójczą (*ang.* lethal toxin) oraz czynnik obrzękowy (*ang.* edema factor). Zarówno geny toksyn (*pag*, *lef*, *cya*), jak i otoczki (*cap*) są zlokalizowane na dużych plazmidach, odpowiednio pXO1 oraz pXO2 [49]. Z kolei u emetycznego szczepu *B. cereus* sensu stricto F4810/72, operon *ces* odpowiedzialny za produkcję syntetazy cereulidyny (toksyny wymiotnej), także ulokowany jest na dużym plazmidzie (pBc270) o wielkości 270 kpz [19, 29]. Synteza owadobójczych białek parasporalnych (*ang.* parasporal crystal inclusions) jest zależna od genów *cry* znajdujących się na dużych i potencjalnie mobilnych plazmidach [62, 68]. Co ciekawe, okazuje się, że m.in. plazmidy pXO1, pBc270 oraz pBc10987 posiadają bardzo podobne mechanizmy replikacji zależnej od konserwatywnego genu *repX*, co pośrednio wskazuje na to, że wszystkie one wywodzą się od wspólnego przodka [36], jedynie w toku ewolucji niektóre z nich (np. pBc10987 u szczepu *B. cereus* sensu stricto ATCC 10987) utraciły wyspę patogenności o wielkości około 20 kpz [58–59]. Podobna obserwacja dotyczy plazmidu pXO2 i podobnych mu elementów np. pBtoxis (128 kpz) obecnego u *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* [10] traktowanych jako plazmidy typu pXO2 z uwagi na podobieństwo replikacji powiązanej z mało zmiennym genem *repA* [36]. Poważnym wyzwaniem może być także zjawisko horyzontalnego transferu genów (*ang.* horizontal gene transfer, HGT) zachodzące w warunkach naturalnych. Choć potwierdzono je na przykład w żywności i glebie [31, 50], to wydaje się, że nadal nie w pełni doceniamy znaczenie koniugacji w biologii całej grupy. Opisano na przykład szczep *B. cereus* sensu stricto G9241, który posiada zarówno plazmid pXO1 jak i powiązaną z jego obecnością zdolność wywoływania objawów

inhalacyjnej postaci węgla [28]. Kolsto i wsp. [38] donoszą o problemach z jednoznaczną identyfikacją *B. anthracis* oraz *B. thuringiensis*. Natomiast szczep *B. cereus* sensu stricto E33L, wywołujący u przeżuwaczy chorobę o objawach silnie przypominających węgla, posiada plazmid pE33L54 (54 kbp) o wysokim podobieństwie sekwencji nukleotydowej w stosunku do plazmidu pXO2 szczepu *B. anthracis* Ames oraz szeregu mniejszych plazmidów homologicznych do wcześniej poznanych plazmidów *B. thuringiensis* [58]. Co więcej, wydaje się, że nie tylko plazmidy, ale także geny chromosomalne, na przykład operony warunkujące syntezę niektórych toksyn, ulegają HGT kształtując zmienność w obrębie *B. cereus* sensu lato [11]. Dane z analizy względnego współczynnika rekombinacji do mutacji (*r/m*) sugerują, że proces transferu genów w obrębie wspomnianych bakterii zachodzi nieustannie ze średnią intensywnością (czego dowodzi wartość współczynnika *r/m* w zakresie 1,5–2,9) i dotyczyć może także plazmidów typu pXO1 oraz typu pXO2 [16,71,73]. Wydaje się zatem, że klasyfikacja wykorzystująca plazmidy, m.in. warunkujące wirulencję nie jest dobrym rozwiązaniem, szczególnie, że plazmidy te mogą być nabywane i traczone w toku ewolucji [42].

Dotychczasowa, wielogatunkowa taksonomia wsparta jest także istotnymi argumentami. Okazuje się, że niektórzy przedstawiciele *B. cereus* sensu lato są stosunkowo monomorficzni. Na przykład *B. anthracis*, poza swoją odmiennością od pozostałych przedstawicieli grupy dotyczącą otoczki, braku ruchliwości i wrażliwości na penicyliny, jest także bardzo jednorodny genetycznie [13, 37, 55]. Podobnie klonalne są też emetyczne szczepy *B. cereus* sensu stricto [20]. Jednak najsilniejsze wsparcie dla koncepcji niezależnych gatunków wiąże się z praktycznym aspektem biologii tych organizmów. Z punktu widzenia medycyny ludzkiej i weterynaryjnej, ważne jest szybkie i precyzyjne wyróżnianie niebezpiecznych szczepów *B. anthracis*. Właściwości owadobójcze *B. thuringiensis* to z kolei podstawa zastosowania tych bakterii w biotechnologii do produkcji transgenicznych roślin (tzw. roślin Bt) oraz preparatów przeciwko owadom szkodnikom upraw (np. Thuricide, Dipel, Foray48D). Wreszcie zdolność do wywoływania zatrucia pokarmowych jest powiązana z przedstawicielami gatunku *B. cereus* sensu stricto.

W chwili obecnej trudno zaproponować jednolitą koncepcję taksonomii *B. cereus* sensu lato. Pogląd o niezależnych gatunkach, choć wygodny w ujęciu praktycznym, nie znajduje pełnego uzasadnienia w danych filogenetycznych. Stąd też ciekawą alternatywą wydaje się pomysł traktowania *B. cereus* sensu lato jako grupy spokrewnionych bakterii, obejmującej odmienne typy ekologiczne (tzw. ekotypy, termotypy) i wirulentne (patotypy) [69]. Takie ujęcie z jednej strony zapewnia zgodność z naturalnym przebiegiem zmian ewolu-

cyjnych, a z drugiej bierze pod uwagę aspekty ważne z punktu widzenia nauk medycznych, biotechnologii i szeroko pojętego przemysłu rolno-spożywczego, gdzie *B. cereus* sensu stricto i spokrewnione z nim bakterie odgrywają także poważną rolę.

2.2. Wyzwanie drugie – cykle życiowe i interakcje z otoczeniem

B. cereus sensu lato odnajdujemy w glebie, wodach, powietrzu, żywności oraz materiale roślinnym i organizmach zwierząt oraz ludzi, co sprawia, że ich interakcje z innymi organizmami muszą być częste i złożone. *B. cereus* sensu lato występują w środowisku w postaci wegetatywnej oraz przetrwalnikowej. Komórka wegetatywna jest aktywna metabolicznie. W sprzyjających warunkach środowiskowych intensywnie namnaża się, dając kolejne generacje bakterii. Podlega także procesom zmienności genetycznej zarówno na drodze mutacji jak i horyzontalnego transferu genów. Przetrwalnik (forma uśpiona), dzięki odwodnieniu cytoplazmy i wysyceniu ściany dipikolinianem, jest niewrażliwy na niesprzyjające czynniki środowiskowe, w tym działanie wysokich temperatur [21, 63]. Do jego kiełkowania niezbędne są odpowiednie induktory, m.in. woda i składniki odżywcze, w tym aminokwasy (m.in. L-alanina), cukry i nukleotydy. Co ciekawe, kiełkujące przetrwalniki *B. cereus* sensu stricto, dzięki aktywności racemazy alaninowej przekształcają dostępną L-alaninę w D-alaninę, która jest inhibitorem kiełkowania dla pozostałych spor sprzyjając ich pozostaniu w środowisku, na wypadek ponownego pogorszenia się warunków [51]. W przypadku niektórych bakterii, kiełkowanie przetrwalników inicjowane jest po ich fagocytozie w makrofagach, jak to ma miejsce w przypadku *B. anthracis* [63].

Zdolność do formowania ciepłoopornych przetrwalników (sporulacja) nabiera szczególnego znaczenia w przemyśle spożywczym, gdzie np. przeżywające proces pasteryzacji spory mogą wpływać na jakość końcowego produktu [4] lub przyczyniać się do wtórnego zanieczyszczenia żywności [5,67].

Sporulacja jest kontrolowana przez sześć białek regulatorowych określanych jako czynniki sigma (σ), które sterują rozpoznawaniem regionów promotorowych przez polimerazę RNA. One z kolei są kontrolowane przez białko Spo0A, czynnik transkrypcyjny sterujący genami odpowiadającymi za sporulację [65]. Ze względu na fakt, że niektóre czynniki regulujące tworzenie przetrwalników są najpierw wydzielane do środowiska, a później z niego pobierane i aktywują proces dopiero po osiągnięciu odpowiedniego stężenia, można przyjąć, iż w regulacji opisywanego procesu bakterie wykorzystują zjawisko *quorum sensing*. Co więcej, w przypadku *B. anthracis* wykazano, że proces formowania przetrwalników oraz wirulencja znajdują się pod

kontrolą białkowych produktów tych samych genów [56]. Należy podkreślić, że spory różnych gatunków nie tylko umożliwiają przetrwanie w niesprzyjających warunkach środowiska, ale ułatwiają rozprzestrzenianie i wnikanie do organizmów żywicieli, gdzie są w stanie kiełkować i namnażać się.

Osobnym zagadnieniem pozostają współzależności z innymi organizmami. Obecnie uważa się, że *B. cereus* sensu stricto, *B. thuringiensis* oraz zapewne *B. toyonensis* są w stanie funkcjonować w środowisku, powiązane obustronnie korzystnymi relacjami z gospodarzem. Namnażanie się w jego jelicie, a następnie formowanie uwalnianych do środowiska w czasie defekacji przetrwalników, prowadzą do rozprzestrzeniania się bakterii w glebie oraz na materiale roślinnym i wodzie. Stąd zaś, najczęściej drogą pokarmową, bakterie mogą ponownie trafić do jelita zamykając swój cykl życiowy [32, 68]. Ta forma wzajemnego oddziaływania przynosi zapewne obustronne korzyści, dowiedziono bowiem, że *B. toyonensis* wykazuje aktywność probiotyczną względem ssaków [33]. Dyskusyjne natomiast jest to, jak długo wspomniane bakterie potrafią utrzymywać się w jelicie. Obecnie przeważa pogląd, że opisana zależność jest długotrwałą formą wzajemnego oddziaływania.

B. cereus sensu lato potrafią także wywoływać choroby ludzi i zwierząt. I tak pałeczka (d. laseczka) wąglika, opisywana historycznie jako jedna z tzw. plag egipskich, w środowisku naturalnym występuje w zasadzie wyłącznie w postaci przetrwalników [18]. Wcześniej teorie, dotyczące obszarów (określanych czasami jako inkubatory wąglikowe), na których bakterie te mogłyby replikować się poza organizmem gospodarza, nie znalazły bowiem potwierdzenia w obserwacjach środowiskowych i zdają się nie mieć uzasadnienia, gdyż *B. anthracis* ma stosunkowo wąskie i specyficzne wymagania odżywcze. Natomiast wraz ze spożyciem skażonej sporami paszy, spory dostają się do organizmu przeżuwacza, a następnie kiełkują w obrębie układu limfaticznego, na przykład w makrofagach. Ich namnażaniu się towarzyszy biosynteza toksyn, co prowadzi do rozwoju objawów choroby i ostatecznej śmierci zwierzęcia. W jego ciele, głównie w surowicy, bakterie osiągną znaczną koncentrację i mogą sporulować, a obecność padlinożerców i naturalne procesy rozkładu prowadzą do rozprzestrzeniania przetrwalników na znacznym obszarze.

W odróżnieniu od wąglika, *B. thuringiensis* uważany jest za patogen larw owadów [68]. Wśród mechanizmów jego wirulencji znajdują się zarówno toksyny Cry (kilkaset rodzajów) formowane w czasie sporulacji, jak i białka produkowane w czasie tzw. fazy wegetatywnej (toksyny VIP, ang. vegetative insecticidal proteins). Choć różne doniesienia wskazują na często odmienne mechanizmy rozprzestrzeniania się *B. thuringiensis* wśród owadów, to wydaje się, że bakterie te mogą namnażać się w jeli-

cie larw bezobjawowo lub wywołując objawy, które nie prowadzą do śmierci. Z ewolucyjnego punktu widzenia taka strategia jest opłacalna, bowiem tylko żywy żywiciel zapewnia optymalne warunki do wzrostu i namnażania się bakterii. W sytuacji ograniczenia dostępności składników odżywczych, zachodzi sporulacja, w czasie której formowane są kryształki parasporalne zawierające toksyny. Wraz z uwolnieniem z ciała larw przetrwalników oraz powiązanych z nimi białek Cry, mogą one rozprzestrzenić się w środowisku do czasu ich ponownego spożycia. Toksyny Cry, po ich wstępnej aktywacji enzymatycznej w jelicie larwy, powodują uszkodzenia w ścianach jelit, co z jednej strony zwiększa dostępność składników odżywczych, z drugiej zaś przyspiesza kiełkowanie spor. Zatem bakterie te mogą funkcjonować najprawdopodobniej jako komensale larw bezkręgowców, czego zresztą pośrednio dowodzą sporadyczne tylko przypadki epidemii spowodowanych przez *B. thuringiensis* wśród larw owadów. Nadal natomiast brakuje przekonujących dowodów na możliwość namnażania się *B. thuringiensis* bezpośrednio w środowisku. Przeważa pogląd, że z uwagi na dość duże wymagania odżywcze, bakterie te raczej nie namnażają się, ewentualnie ich namnażanie się jest ograniczone do wyjątkowo zasobnych w składniki odżywcze nisz ekologicznych [68].

Właściwości ekologiczne *B. cereus* sensu stricto nie są w pełni poznane. Pierwsze obserwacje tej bakterii wskazywały na jej powszechność w jelitach bezkręgowców, gdzie opisywano je jako tzw. stadium *Arthromitus* przejawiające się obecnością długich nitkowatych tworów uformowanych z komórek bakteryjnych [32]. Obecność *B. cereus* sensu stricto w jelitach kręgowców, w tym człowieka, nie powinna być zaskoczeniem choćby z uwagi na częstość występowania w żywności, skąd bez problemów przedostaje się do jelita. Dlatego też warta rozważenia wydaje się koncepcja stanowiąca uzupełnienie dwóch pozostałych, sugerująca znaczenie żywności oraz przemysłu rolno-spożywczego w rozprzestrzenianiu *B. cereus* sensu stricto wśród ludzi. Liczne doniesienia wskazują na obecność tej bakterii w przyprawach, produktach mącznych, sałatkach, warzywach i owocach oraz przede wszystkim produktach mleczarskich. Linie przetwarzania mleka były niejednokrotnie wskazywane jako źródło wtórnego zanieczyszczenia żywności pasteryzowanej [4]. Wydaje się także, że *B. cereus* sensu stricto ma potencjał do współtworzenia trudnych do wyeliminowania biofilmów, co komplikuje i tak niełatwe próby eliminacji tej bakterii z surowców wykorzystywanych w przemyśle spożywczym.

Jeszcze mniej wiadomo o psychrotolerancyjnych przedstawicielach grupy, a w szczególności o *B. mycoides*. Bakteria ta obecna jest w glebie, szczególnie w ryzosferze, gdzie wydaje się wykazywać antagonizm

względem m.in. grzybów z rodzaju *Fusarium*. [15]. Izolowano ją także z przewodów pokarmowych bezkręgowców. Pomimo wykrycia genów enterotoksyn, obecność *B. mycooides* w żywności nie jest traktowana w kategoriach zagrożenia, gdyż nie opisano dotąd przypadków zatruc pokarmowych powodowanych przez te bakterie. Stąd przypuszczać można, że adaptacja do umiarkowanych temperatur oraz powiązany z tym inny skład kwasów tłuszczowych, z większym udziałem form nienasyconych, to przede wszystkim przystosowania do egzystowania w warunkach glebowych, a transmisja do organizmów zwierząt jest tylko dodatkowym elementem ułatwiającym rozprzestrzenianie się tej bakterii. Jednocześnie niższa optymalna temperatura wzrostu sprawia, że namnażają się one wolniej, a zarazem podlegają mniejszej zmienności mutacyjnej, co potwierdzają także analizy względnego współczynnika rekombinacji do mutacji, osiągając najniższe wartości w przypadku tych właśnie bakterii (Bartoszewicz M., dane niepublikowane).

2.3. Wyzwanie trzecie – adaptacja do niskich temperatur

B. cereus sensu lato zajmują różnorodnie środowiska, co wymaga od nich szeregu przystosowań pozwalających na efektywne bytowanie w zajmowanych niszach ekologicznych i skuteczną konkurencję z obecną tam mikroflorą. Jedną z ważniejszych adaptacji do środowiska u wybranych przedstawicieli *B. cereus* sensu lato jest psychrotolerancja, czyli zdolność do wzrostu w temperaturze 7°C lub niższej [4]. Zazwyczaj cechy tej towarzyszy brak namnażania się powyżej 42–45°C [40]. Podłożem adaptacji do chłodu jest szereg istotnych właściwości biochemicznych i fizjologicznych, takich jak zapobieganie uszkodzeniu komórek w wyniku krystalizacji wody, zapewnienie ciągłości procesów metabolicznych związanych z syntezą białek oraz pozyskiwaniem energii przy równoczesnym zachowaniu odpowiedniego poziomu aktywności i płynności błon komórkowych [70, 72].

W przypadku *B. cereus* sensu lato warunki te spełnione są przede wszystkim dzięki zdolności do syntezy białek szoku zimna (Csp, *ang.* cold shock proteins), spośród których główną rolę odgrywa białko CspA [72]. Jest to niewielka proteina (7 kDa) zawierająca pięć antyrównoległych łańcuchów β , które razem formują strukturę β -beczki (*ang.* β -barrel). Na powierzchni takiej cząsteczki eksponowane są aminokwasy aromatyczne, które odgrywają podstawową rolę w wiązaniu się białka CspA do RNA i DNA, a wewnątrz CspA stanowią liczne aminokwasy hydrofobowe formujące rdzeń białkowy [72]. Poznane dotychczas białka szoku zimna charakteryzuje zdolność do wiązania się do specyficznego fragmentu jednoniciowych cząsteczek DNA, tzw.

fragmentu Y (ATTGG) lub komplementarnej do niego sekwencji [22–23]. Fundamentalnym jednak mechanizmem działania białek CspA jest ochrona mRNA przed formowaniem drugorzędowych struktur w wyniku obniżania się temperatury środowiska.

Adaptacja bakterii do niskich temperatur wymaga dodatkowo innych przystosowań. Uważa się, że za reakcję komórki bakteryjnej na spadek temperatury odpowiedzialne są rybosomy, pełniące poza translacją, dodatkową rolę „czujników” zmiany temperatury. Gdy na skutek obniżania temperatury dochodzi do zatrzymania translacji większości białek, indukowane szokiem zimna proteiny Csp są nadal syntetyzowane dzięki obecności elementów DB (Downstream Box) w sekwencjach nukleotydowych flankujących geny tych białek. Elementy DB zapewniają dodatkowe miejsce wiązania w rybosomie, prawdopodobnie na skutek interakcji z 16S rRNA. To z kolei prowadzi do indukcji syntezy rybosomalnych czynników regulacyjnych, na przykład CsdA bądź RbfA, a w konsekwencji do wydajnego formowania kompleksów translacyjnych zapewniających biosyntezę wszystkich białek, niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania komórki [72].

Efektywne prowadzenie procesów życiowych w chłdzie wymaga dodatkowo zachowania aktywności i płynności błon komórkowych, co zostaje osiągnięte poprzez zwiększenie udziału nienasyconych kwasów tłuszczowych w tych strukturach. Dowiedziono, że spadek temperatury z 28°C do 10°C w ciągu 16 godzin skutkowało zmniejszeniem udziału nasyconych kwasów tłuszczowych w błonie komórkowej *B. subtilis* z 23,9% do 13,4% wraz z równoczesnym wzrostem udziału kwasów nienasyconych, przede wszystkim kwasu γ -linoleinowego [70]. W przypadku *B. megaterium* i *B. subtilis* wykazano, że biosynteza nienasyconych kwasów tłuszczowych w 35°C jest wysoce ograniczona. Obniżenie temperatury do 20°C uaktywnia desaturazy kwasów tłuszczowych, uruchamiając tym samym szlak syntezy kwasów z wiązaniami wielokrotnymi.

Psychrotolerancja *B. cereus* sensu lato nie została nadal poznana w sposób wyczerpujący. Brak jest na przykład szczegółowych danych dotyczących adaptacji do chłodu innych przedstawicieli grupy, na przykład *B. wiedmannii*. Wiadomo jednak, że gatunek ten nie posiada typowej dla *B. weihenstephanensis* i *B. mycooides* sekwencji w genie *cspA*. Nie można zatem wykluczyć, że na skutek podobnej presji selekcyjnej i zjawiska konwergencji, adaptacja do wzrostu w niskich temperaturach wyewoluowała w obrębie *B. cereus* sensu lato niezależnie w dwóch lub więcej układach. Tym ważniejsze jest więc ustalenie zakresu rozprzestrzeniania psychrotolerancyjnych szczepów *B. cereus* sensu lato w kontekście znaczenia tej cechy w mikrobiologii żywności, kosmetyków i produktów farmaceutycznych. Należy także zweryfikować słuszność wyróżniania

B. weihenstephanensis jako odrębnego gatunku na podstawie dostępnych przesłanek i odpowiedzieć na pytanie, czy szczepy klasyfikowane do tego taksonu mogą być odpowiedzialne za zatrucia pokarmowe oraz obniżenie jakości artykułów spożywczych, kosmetycznych i wyrobów medycznych.

2.4. Wyzwanie czwarte – toksyny *B. cereus* sensu lato

Bakterie *B. cereus* sensu lato biosyntetyzują szereg toksyn bakteryjnych, z których część jest charakterystyczna dla pojedynczych gatunków, inne są szeroko rozprzestrzenione w obrębie grupy, a nawet rodzaju [57]. Do najważniejszych zaliczamy (i) enterotoksyny biegunkowe, (ii) toksynę wymiotną (cereulidynę), (iii) owadobójcze toksyny *B. thuringiensis* (białka Cry, VIP, Cyt i chitynazy) oraz (iv) toksyny powodujące węglik [7, 9, 66, 68].

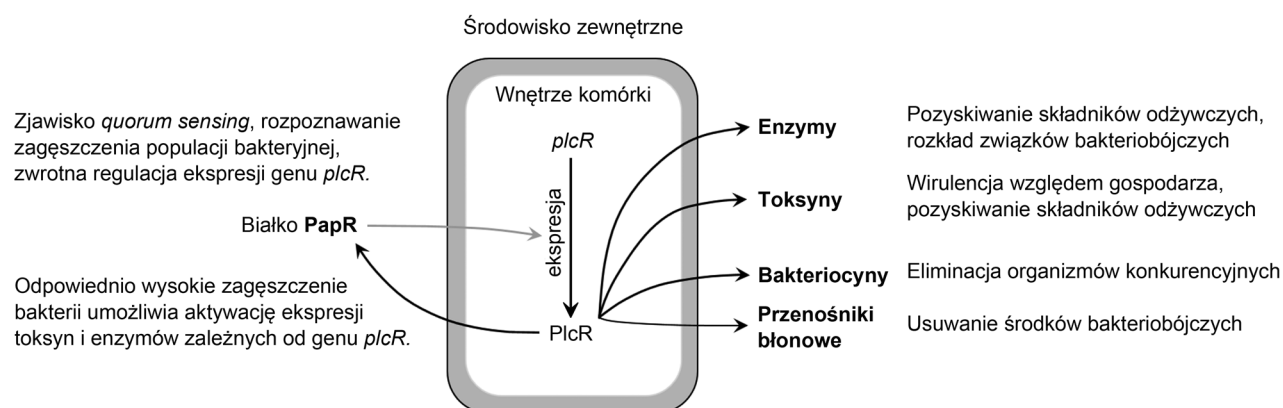
Za podstawowy czynnik etiologiczny zatruc pokarmowych *B. cereus* sensu stricto uważana jest hemolizyna BL (HBL), trójelementowa toksyna białkowa składająca się z dwóch podjednostek litycznych (L1, L2) oraz jednego elementu łączącego B, o masie odpowiednio 38, 46 i 37 kDa [66]. Kodujące ją geny są zebrane w zlokalizowany na chromosomie operon *hbl*. Mechanizm działania toksyny HBL opiera się na formowaniu porów w błonie komórki docelowej, co prowadzi do zaburzenia gospodarki jonowej i w konsekwencji do jej lizy. Wykazano także, że enterotoksyna hemolityczna posiada działanie dermonekrotyczne oraz istotnie zwiększa przepuszczalność naczyń [7]. Co ciekawe, mimo iż operon *hbl* obecny jest u około połowy szczepów *B. cereus* sensu lato (z wyjątkiem szczepów emetycznych), notowany jest m.in. w genomach *B. coagulans*, *B. polymyxa*, *B. amyloliquefaciens*, *B. circulans*, *B. lentimorbis* oraz *B. pasteurii* [57].

Enterotoksyna niehemolityczna (NHE) wykazuje szereg podobieństw w stosunku do HBL. Została ona wyizolowana, oczyszczona i scharakteryzowana w oparciu o materiał pobrany od 152 osób z zatruciem pokarmowym w Norwegii [44]. Ustalono, że toksyna ta także składa się z trzech elementów białkowych: NheA (41 kDa), NheB (40 kDa) oraz NheC (36 kDa), a geny je kodujące zebrane są w jeden operon *nhe*. Element NheB łącząc się z błoną komórki docelowej, przyłącza komponenty NheA oraz NheC, które razem doprowadzają do lizy komórki, wobec czego przyjmuje się, że do pełnej aktywności toksyny niezbędne są wszystkie trzy jej składniki. NHE obecna jest powszechnie, notuje się ją u ponad 90% badanych szczepów. Ponadto nie stwierdzono zależności pomiędzy obecnością operonu *nhe* a zdolnością do formowania innych toksyn. Zaobserwowano natomiast istotnie niższą częstość występowania operonu *nhe* u szczepów reprezentujących *B. weihenstephanensis* i inne bakterie z tego samego

(szóstego w analizach filogenetycznych techniką MLST) kładu filogenetycznego [66]. Należy podkreślić, że podobieństwo strukturalne NHE i HBL oraz zależność ich ekspresji od regulonu *PlcR* wskazują, że obie toksyny mają wspólną genezę.

Spożycie produktów zanieczyszczonych bakteriami *B. cereus* sensu lato zdolnymi do biosyntezy jednoskładnikowej cytotoksyny K (CytK) także może prowadzić do objawów zatrucia pokarmowego, choć sama aktywność toksyny jest ściśle uzależniona od jej budowy chemicznej. Okazuje się, że przypadki śmiertelnych zatruc pokarmowych powiązane z CytK-1, która jest właściwa szczepom *B. cytotoxicus*, natomiast CytK-2 obecna przede wszystkim u *B. cereus* sensu stricto, *B. thuringiensis* oraz *B. mycoides* wywołuje zdecydowanie łagodniejsze i niezagrażające życiu objawy [43]. W obu przypadkach jednak prowadzi do formowania porów anionowych i w konsekwencji do uszkodzenia enterocytów, co skutkuje lokalnymi stanami zapalnymi i krwawą biegunką. Pod względem zaś budowy i mechanizmu działania, cytotoksyna K wykazuje wyraźne podobieństwa do γ -hemolizyn *Staphylococcus aureus* oraz β -toksyny *Clostridium perfringens* [66].

Wspomniane toksyny *B. cereus* sensu lato wydzielane są pozakomórkowo i prowadzą do rozpadu komórek zainfekowanych organizmów. Poza HBL, NHE oraz CytK, także szereg hemolizyn i fosfolipaz narusza integralność błon komórkowych. Z pozycji bakterii właściwość ta jest bardzo korzystna, gdyż zwiększa dostępność składników pokarmowych poprzez uwalnianie ich z komórek gospodarza. Co więcej, w badaniach Guillemet i wsp. [24] wykazano silną cytotoksyczność wielu sekretyn *B. cereus* sensu lato w stosunku do makrofagów, co ułatwia przełamywanie barier immunologicznych gospodarza i rozprzestrzeniania się infekcji. Dodatkowo uważa się, że proces agregacji bakterii na powierzchni nabłonka jelitowego powoduje zwiększoną koncentrację mediatorów chemicznych biorących udział w zjawisku *quorum sensing* powiązanych z aktywnością regulonu *plcR*. Mediatorzy te stymulują bakterie do bardziej intensywnej sekrecji enterotoksyn, w konsekwencji czego nasila się ich miejscowe działanie. Sugeruje się nawet, że komórki, które nie ulegną przytwierdzeniu do nabłonka jelitowego i nie osiągną odpowiedniej koncentracji, nie będą w stanie wydelać toksyn [60]. Przy okazji rysuje się inny ciekawy aspekt enterotoksyczności *B. cereus* sensu lato. Bakterie te bowiem są w stanie ułatwiać także rozwijanie się infekcji wywoływanych przez inne mikroorganizmy. Uszkodzenie błon komórkowych, masowna utrata soku komórkowego, zmiany pH w środowisku sprawiają, że oportunistyczne bakterie pozbawione szeregu mechanizmów zjadliwości są w stanie wspólnie z *B. cereus* sensu lato, odżywiać się, namnażać i rozprzestrzeniać po zaatakowanym organizmie [60].



Rys. 2. Oddziaływanie regulonu PlcR na wybrane aktywności wydzielnicze komórek *B. cereus* sensu lato

Osobną sprawą jest znaczenie plejotropowego genu regulatorowego *plcR*. Poza sterowaniem ekspresją genów enterotoksyn, proteaz i fosfolipazy C, a więc podstawowych czynników wirulencji *B. cereus* sensu lato, wpływa on także na mechanizmy umożliwiające pozyskiwanie składników odżywczych oraz eliminację konkurencyjnej mikroflory (Rys. 2). Podstawowy mechanizm regulacyjny oparty jest o aktywność niewielkiego, bo złożonego z 48 aminokwasów peptydu sygnałowego PapR wydzielanego zewnątrzkomórkowo, a następnie wtórnie pobieranego ze środowiska dzięki permeazie Opp [64]. W komórce peptyd PapR ulega pentameryzacji i aktywuje kolejne przemiany powiązane z przyłączeniem PlcR do docelowych sekwencji w DNA komórki. Co więcej, uważa się ten mechanizm za specyficzny dla szczepów, dzięki czemu może on wspierać wyłącznie namnażanie się i toksyczność określonych i wrażliwych na niego bakterii.

Wymiotna postać zatruc pokarmowych to z kolei efekt intoksykacji cereulidyną – toksyną wymiotną w postaci cyklicznego dodekadepsyptetydu wytwarzanego w drodze nierybosomalnej syntezy [39]. Najczęściej wykrywa się szczepy zdolne do formowania cereulidyny w produktach spożywczych zawierających ryż oraz mleko, choć bakterie te izolowano także z gleby [5]. Cereulidyna przypomina pod względem budowy i mechanizmu działania walinomycynę, peptydowy antybiotyk syntetyzowany przez *Streptomyces griseus* i *S. tsusimaensis* [12]. Efektem intoksykacji jest wzrost przewodnictwa transbłonowego (tworzone są kanały potasowe), powiększanie mitochondriów oraz inhibicja przebiegu łańcucha oddechowego, wakuolizacja komórek i zmiany kondensacji chromatyny w jądrze komórkowym [53,54]. Należy podkreślić, że z uwagi na szybki rozwój objawów, których natężenie zależy od dawki toksyny, zatrucia cereulidyną mogą przebiegać gwałtownie i prowadzić do rozwoju ostrej niewydolności wątroby, zespołu hemolityczno-mocznicy, obrzęku mózgu i śmierci [17]. Cereulidyna może także zwiększać tempo apoptozy niezależnej i zależnej od

kaspaz [45], stąd nadzieja na ewentualne jej zastosowanie w terapii niektórych chorób rozrostowych [39]. Mimo, że obecność operonu *ces* (warunkującego syntezę cereulidyny) notowano u blisko spokrewnionych szczepów, jego plazmidowa lokalizacja (plazmid typu pXO1) i potwierdzona obecność u *B. weihenstephanensis*, rodzi potrzebę zweryfikowania hipotezy mówiącej, że wszystkie szczepy emetyczne tworzą wąską linię ewolucyjną w obrębie gatunku *B. cereus* sensu stricto [20, 30].

Wirulencja *B. anthracis* wymaga obecności dwóch dużych plazmidów: pXO1 (181 kbp) oraz pXO2 (90 kbp). Na pierwszym z nich znajdują się geny *pag*, *lef* oraz *cya* kodujące odpowiednio: antygen ochronny PA, czynnik letalny LF oraz czynnik obrzękowy EF [48]. Z nich zaś formowane są dwie aktywne toksyny: toksyna zabójcza (PA-LF) oraz toksyna obrzękowa (PA-EF). Dodatkowo, w celu zapobiegania fagocytozie wirulentne komórki *B. anthracis* formują otoczkę, złożoną z kwasu poli-D-glutaminowego. Synteza tej otoczki jest warunkowana obecnością genu *cap*, zlokalizowanego na plazmidzie pXO2 [48]. W pierwszym etapie działania toksyny węglik, następuje fuzja antygeny ochronnego PA z wrażliwą komórką, po czym od PA oddysocjowuje niewielki fragment białka o ciężarze 20 kDa (PA20), pozostawiając połączony z błoną komórkową element PA63 (63 kDa). Do tak przekształconego białka PA63 mogą się wiązać elementy LF lub EF. Taki kompleks w postaci endosomu trafia do wnętrza komórki, gdzie ulega uwolnieniu do cytozolu. Tam czynnik EF (funkcjonujący jako cyklaza adenylanowa) powoduje wzrost poziomu cAMP, interleukiny 6 (IL-6) oraz czynnika martwicy guza (TNF- α), co wywołuje miejscowy obrzęk. Z kolei toksyna letalna LF jest metaloproteazą, która pośrednio inaktywuje specyficzne kinazy komórkowe z rodziny MAPK (*ang.* mitogen-activated protein kinases), co zaburza przekazywanie sygnału w komórce i prowadzi do apoptozy [48]. Efektem toksyczności pałeczek węglik jest rozwój pełnych objawów choroby, które w zależności od postaci i drogi zakażenia (płucna, pokarmowa lub skórna) mogą przyjmować

odmienną formę rzutuującą na przebieg infekcji oraz rokowania dla pacjenta.

B. thuringiensis wykazuje aktywność w odniesieniu do bezkręgowców, a szczególnie larw wrażliwych owadów. Syntetyzuje bowiem ponad 100 rodzajów specyficznych dla rodzaju/gatunku różnorodnych krystalicznych białek parasporalnych określanymi jako białka Cry. Na przykład białka Cry 1 są aktywne w stosunku do przedstawicieli rzędu *Lepidoptera* (obejmującego między innymi motyle), Cry 3 działają bójkco na chrząszcze z rzędu *Coleoptera*, a Cry 11 na *Diptera* (m.in. komary). Co ciekawe, białka Cry formowane są w postaci nieaktywnych protoksyn, a dopiero ich enzymatyczna aktywacja umożliwia im reakcję ze swoistym receptorem w ścianie jelita [68]. Ten proces prowadzi do formowania porów, co powoduje wysięk do światła jelita larwy, uniemożliwia jej odżywianie się i powoduje śmierć wrażliwego organizmu. Ułatwia także rozprzestrzenianie się bakterii po całej zainfekowanej larwie.

Blisko połowa szczepów *B. thuringiensis* syntetyzuje także odporne na działanie temperatur egzotoksyny, na przykład egzotoksynę I. W czasie wzrostu wegetatywnego obserwuje się ponadto biosyntezę wegetatywnych białek owadobójczych czyli tzw. toksyn VIP, a także cytolitycznej toksyny Cyt oraz chitynazy [9, 68]. Specyficzność i różnorodność toksyn owadobójczych produkowanych przez *B. thuringiensis* daje duże możliwości zwalczania szkodników owadzi, ponadto pozwala, dzięki wysokiej skuteczności i specyficzności, unikać narastania zjawiska oporności larw owadów i przy okazji oszczędzać organizmy pożyteczne, na przykład pszczołę miodną.

3. Podsumowanie

B. cereus sensu lato występują powszechnie w środowisku naturalnym wykazując różnorodne interakcje z organizmami żywymi. Poszczególne przedstawiciele tej grupy zajmują różnorodne nisze ekologiczne, z których łatwo mogą przedostawać się do organizmów żywych bądź surowców wykorzystywanych w produkcji żywności. Z uwagi na podobieństwo genetyczne oraz duże znaczenie horyzontalnego transferu genów w biologii *B. cereus* sensu lato, wydaje się zasadnym traktowanie całej grupy jako jednego polimorficznego gatunku bakteryjnego, w obrębie którego wyróżniają się typy filogenetyczne o odmiennych właściwościach ekologicznych i chorobotwórczych. Cechy te mają także ogromne znaczenie z punktu widzenia diagnostyki medycznej i weterynaryjnej. Psychrotolerancja i zdolność do syntezy różnorodnych czynników wirulencji sprawiają, że *B. cereus* sensu lato nadal pozostają ważnym zagrożeniem dla konsumentów. Okazuje się, że zdolność do formowania toksyn to nie tylko przejaw

przystosowania się do wirulentnego trybu życia, ale także sposób na efektywne wykorzystywanie zasobów środowiska i komunikowanie się między bakteriami. *B. cereus* sensu lato stanowią ciekawy model badawczy zarówno w odniesieniu do interakcji na poziomie bakteria-środowisko, jak i bakteria-gospodarz oraz bakteria-bakteria. Dostarczają także cennych danych do prac nad spójną i jednolitą koncepcją gatunku bakteryjnego.

Podziękowania

Niniejsza praca zawiera wyniki uzyskane w trakcie realizacji badań naukowych finansowanych w ramach projektu badawczego Narodowego Centrum Nauki (na podstawie decyzji nr DEC-2011/03/B/NZ8/02835).

Piśmiennictwo

- Ash C., Farrow J.A.E., Wallbanks S., Collins M.D.: Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequences. *Let. Appl. Microbiol.* **13**, 202–206 (1991)
- Auch A.F., von Jan M., Klenk H.P., Goker M.: Digital DNA-DNA hybridization for microbial species delineation by means of genome-to-genome sequence comparison. *Stand. Genomic Sci.* **28**, 117–134 (2010)
- Bartoszewicz M., Bideshi D.K., Kraszewska A., Modzelewska E., Świącicka I.: Natural isolates of *Bacillus thuringiensis* display genetic and psychrotrophic properties characteristic of *Bacillus weihenstephanensis*. *J. Appl. Microbiol.* **106**, 1967–1975 (2009)
- Bartoszewicz M., Hansen B.M., Świącicka I.: *Bacillus cereus* sensu lato are commonly present contaminants of fresh and heat-treated milk. *Food Microbiol.* **25**, 588–596 (2008)
- Bartoszewicz M., Kroteń M.A., Świącicka I.: Germination and proliferation of emetic *Bacillus cereus* sensu lato strains in milk. *Folia Microbiol.* **58**, 529–535 (2013)
- Bartoszewicz M., Marjańska P.S.: Milk-originated *Bacillus cereus* sensu lato strains harbouring *Bacillus anthracis*-like plasmids are genetically and phenotypically diverse. *Food Microbiol.* **67**, 23–30 (2017)
- Bartoszewicz M., Świącicka I., Buczek J.: Cereulidyna i enterotoksyny *Bacillus cereus* sensu lato. *Med. Weter.* **62**, 28–31 (2006)
- Bavykin S.G., Lysov Y.P., Zakhariev V., Kelly J.J., Jackman J., Stahl D.A., Cherni A.: Use of 16S rRNA, 23S rRNA, and *gyrB* sequence analysis to determine phylogenetic relationships of *Bacillus cereus* group microorganisms. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 3711–3730 (2004)
- Bednarczyk A., Dackowska-Kozon E.G.: Czynniki patogenności bakterii z grupy *Bacillus cereus*. *Post. Microbiol.* **47**, 51–63 (2008)
- Berry C., O'Neil S., Ben-Dov E., Jones A.F., Myrphy L., Quail M.A., Holden M.T.G., Harris D., Zaritsky A., Parkhill J.: The toxin-coding plasmid of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 5082–5095 (2002)
- Bohm M.E., Huptas C., Krey V.M., Scherer S.: Massive horizontal gene transfer, strictly vertical inheritance and ancient duplications differentially shape the evolution of *Bacillus cereus* enterotoxin operons *hbl*, *cytK* and *nhe*. *BMC Evol. Biol.* **15**, 246 (2015)
- Cheng Y-Q.: Deciphering the biosynthetic codes for the potent anti-SARS-CoV cyclodepsipeptide valinomycin in *Streptomyces tsuimaensis* ATCC 15141. *Chem. Bio. Chem.* **7**, 471–477 (2006)

13. Cherif A., Brusetti L., Borin S., Rizzi A., Boudabous A., Khyami-Horani H., Daffonchio D.: Genetic relationship in the *Bacillus cereus* group by rep-PCR fingerprinting and sequencing of a *Bacillus anthracis*-specific rep-PCR fragment. *J. Appl. Microbiol.* **94**, 1108–1119 (2003)
14. Cohan F.M.: Sexual isolation and speciation in bacteria. *Genetica*, **116**, 359–370 (2002)
15. Czaban J., Książek A., Perzyński A.: An attempt to protect winter wheat against *Fusarium culmorum* by the use of rhizobacteria *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus mycoides*. *Pol. J. Microbiol.* **53**, 175–182 (2004)
16. Didelot X., Barker M., Falush D., Priest F.G.: Evolution of pathogenicity in the *Bacillus cereus* group. *Syst. Appl. Microbiol.* **32**, 81–90 (2009)
17. Dierick K., van Coillie C., Świącicka I., Meyfroidt G., Devlieger H., Meulemans A., Hoedemaekers G., Fourie L., Heyndrickx M., Mahillon J.: A fatal family outbreak of *Bacillus cereus* food poisoning. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 4277–4279 (2005)
18. Driks A.: *Bacillus anthracis* spore. *Mol. Asp. Med.* **30**, 368–373 (2009)
19. Ehling-Schulz M., Fricker M., Grallert H., Rieck P., Wagner M., Scherer S.: Cereulide synthetase gene cluster from emetic *Bacillus cereus*: Structure and location on a mega virulence plasmid related to *Bacillus anthracis* toxin plasmid pXO1. *BMC Microbiol.* **6**, 20 (2006)
20. Ehling-Schulz M., Scherer S. i wsp.: Emetic toxin formation of *Bacillus cereus* is restricted to a single evolutionary lineage of closely related strains. *Microbiology*, **151**, 183–197 (2005)
21. Errington J.: Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nat. Rev. Microbiol.* **1**, 117–126 (2003)
22. Graumann P.L., Marahiel M.A.: The major cold shock protein of *Bacillus subtilis* CspB binds with high affinity to the ATTGG- and CCAAT sequences in single stranded oligonucleotides. *FEBS Lett.* **338**, 157–160 (1994)
23. Graumann P.L., Marahiel M.A.: Cold shock response in *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **1**, 203–209 (1999)
24. Guillemet E., Cadot C., Tra S.-L., Guinebretiere M.-H., Lereclus D., Ramaro N.: The InhA metalloproteases of *Bacillus cereus* contribute concomitantly to virulence. *J. Bacteriol.* **192**, 286–294 (2010)
25. Guinebretiere M.-H., Sorokin A. i wsp.: *Bacillus cytotoxicus* sp. nov. is a novel thermotolerant species of the *Bacillus cereus* group occasionally associated with food poisoning. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **63**, 31–40 (2013)
26. Guinebretiere M.H., de Vos P. i wsp.: Ecological diversification in the *Bacillus cereus* group. *Environ. Microbiol.* **10**, 851–865 (2008)
27. Helgason E., Okstad O.A., Caugant D.A., Johansen H.A., Fouet A., Mock M., Hegna I., Kolsto A.-B.: *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* – one species on the basis of genetic evidence. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 2627–2630 (2000)
28. Hoffmaster A.R., Fraser C.M. i wsp.: Identification of anthrax toxin genes in a *Bacillus cereus* associated with an illness resembling inhalation anthrax. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 8449–8454 (2004)
29. Hoton F.M., Andrup L., Świącicka I., Mahillon J.: The cereulide genetic determinants of emetic *Bacillus cereus* are plasmid-borne. *Microbiology*, **151**, 2121–2124 (2005)
30. Hoton F.M., Fornelos N., N'Guessan E., Hu X., Świącicka I., Dierick K., Jaaskelainen E., Salkinoja-Salonen M., Mahillon J.: Family portrait of *Bacillus cereus* and *Bacillus weihenstephansensis* cereulide-producing strains. *Environ. Microbiol. Rep.* **1**, 177–183 (2009)
31. Hu X., Hansen B.M., Eilenberg J., Hendriksen N.B., Smidt L., Yuan Z., Jensen G.B.: Conjugative transfer, stability and expression of a plasmid encoding a *cryIAC* gene in *Bacillus cereus* group strains. *FEMS Microbiol. Lett.* **231**, 45–52 (2004)
32. Jensen G.B., Hansen B.M., Eilenberg J., Mahillon J.: The hidden lifestyles of *Bacillus cereus* and relatives. *Environ. Microbiol.* **5**, 631–640 (2003)
33. Jimenez G., Urdiain M., Cifuentes A., Lopez-Lopez A., Blanch A.R., Tamames J., Kampfer P., Kolsto A.-B., Ramon D., Martinez J.F.: Description of *Bacillus toyonensis* sp. nov., a novel species of the *Bacillus cereus* group, and pairwise genome comparison of the species of the group by means of ANI calculations. *Syst. Appl. Microbiol.* **36**, 383–391 (2013)
34. Jung M.Y., Kim J.S., Peak W.K., Lim J., Lee H., Kim P.I., Ma J.Y., Kim W., Chang Y.H.: *Bacillus manliponensis* sp. nov., a new member of the *Bacillus cereus* group isolated from foreshore tidal flat sediment. *J. Microbiol.* **49**, 1027–1032 (2011)
35. Jung M.-Y., Paek W.K., Park I.-S., Han J.R., Sin Y., Peak J., Rhee M.-S., Kim H., Song H.S., Chang Y.-H.: *Bacillus gaemokensis* sp. nov., isolated from foreshore tidal flat sediment from the Yellow Sea. *J. Microbiol.* **48**, 867–871 (2010)
36. Kaminska P.S., Yernazarova A., Drewnowska J. M., Zambrowski G., Swiecicka I.: The worldwide distribution of genetically and phylogenetically diverse *Bacillus cereus* isolates harbouring *Bacillus anthracis*-like plasmids. *Environ. Microbiol. Rep.* **7**, 738–745 (2015)
37. Keim P., Gruendike J.M., Klevytska A.M., Schupp J.M., Challa-lacombe J., Okinaka R.: The genome and variation of *Bacillus anthracis*. *Mol. Asp. Med.* **30**, 397–405 (2009)
38. Kolsto A.-B., Tourasse N.J., Okstad A.: What sets *Bacillus anthracis* apart from other *Bacillus* species? *Annu. Rev. Microbiol.* **63**, 451–476 (2009)
39. Kroteń M.A., Bartoszewicz M., Świącicka I.: Cereulide and valinomycin, two important natural dodecadepsipeptides with ionophoretic activities. *Pol. J. Microbiol.* **59**, 3–10 (2010)
40. Lechner S., Mayr R., Francis K.P., Pruß B.M., Kaplan T., Wießner-Gunkel E., Steward G.S.A.B., Scherer S.: *Bacillus weihenstephansensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**, 1373–1382 (1998)
41. Liu B., Liu G.H., Hu G.S., Sengonca C., Lin N.Q., Tang J.Y., Tang W.Q., Lin Y.Z.: *Bacillus bingmayongensis* sp. nov., isolated from the pit soil of the Emperor Qin's Terra-cotta warriors in China. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **105**, 501–510 (2014)
42. Liu Y., Lai Q., Goker M., Meier-Kolthoff J.P., Wang M., Sun Y., Wang L., Shao Z.: Genomic insights into the taxonomic status of the *Bacillus cereus* group. *Sci. Rep.* **5**, 14082 (2015)
43. Lund T., De Buyser M.L., Granum P.E.: A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. *Mol. Microbiol.* **38**, 254–261 (2000)
44. Lund T., Granum P.E.: Characterization of a non-hemolytic enterotoxin complex from *Bacillus cereus* isolated after a food-borne outbreak. *FEMS Microbiol. Lett.* **141**, 151–156 (1996)
45. Maianski N.A., Roos D., Kuijpers T.W.: Tumor necrosis factor alpha induces a caspase – independent death pathway in human neutrophils. *Blood*, **101**, 1987–1995 (2003)
46. Małek W., Wdowiak-Wróbek S., Kalita M., Świącicka I.: W poszukiwaniu koncepcji gatunku bakteryjnego. *Post. Mikrobiol.* **44**, 323–328 (2005)
47. Miller R.A., Beno S.M., Kent D.J., Carroll L.M., Martin N.H., Boor K.J., Kovac J.: *Bacillus wiedmannii* sp. nov., a psychrotolerant and cytotoxic *Bacillus cereus* group species isolated from dairy foods and dairy environments. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **66**, 4744–4753 (2016)
48. Moayeri M., Leppla S.H.: Cellular and systemic effects of anthrax lethal toxin and edema toxin. *Mol. Asp. Med.* **30**, 439–455 (2009)
49. Moayeri M., Leppla S.H., Vrentas C., Pomerantsev A.P., Liu S.: Anthrax pathogenesis. *Annu. Rev. Microbiol.* **69**, 185–208 (2015)

50. Modrie P, Beuls E., Mahillon J. Differential plasmid transfer dynamics of pAW63 plasmid among members of the *Bacillus cereus* group in food microcosms. *J. Appl. Microbiol.* **108**, 888–897 (2010)
51. Moir A., Corfe B.M., Behravan J.: Spore germination. *Cell. Mol. Life Sci.* **59**, 403–409 (2002)
52. Nakamura L.K.L.: *Bacillus pseudomycooides* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**, 1031–1035 (1998)
53. Paananen A., Jarvinen K., Sareneva T., Salkinoja-Salonen M.S., Timonen T., Holtta E.: Valinomycin induced apoptosis of human NK cells is predominantly caspase independent. *Toxicology*, **212**, 37–45 (2005)
54. Paananen A., Mikkola R., Sareneva T., Matikainen S., Hess M., Andersson M., Julkunen I., Salkinoja-Salonen M.S., Timonen T.: Inhibition of human natural killer cell activity by cereulide, an emetic toxin from *Bacillus cereus*. *Clin. Exp. Immunol.* **129**, 420–428 (2002)
55. Patino-Navarrete R., Sanchis V.: Evolutionary processes and environmental factors underlying the genetic diversity and lifestyles of *Bacillus cereus* group bacteria. *Res. Microbiol.* **168**, 309–318 (2017)
56. Perego M., Hoch J.A.: Commingling regulatory systems following acquisition of virulence plasmids by *Bacillus anthracis*. *Trends Microbiol.* **16**, 215–221 (2008)
57. Phelps R.J., McKillip J.L.: Enterotoxin production in natural isolates of *Bacillaceae* outside the *Bacillus cereus* group. *FEMS Microbiol. Lett.* **68**, 3147–3151 (2002)
58. Rasko D.A., Altherr M.R., Han C.S., Ravel J.: Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**, 303–329 (2005)
59. Rasko D.A., Read T.D. i wsp.: The genome sequence of *Bacillus cereus* ATCC 10987 reveals metabolic adaptations and a large plasmid related to *Bacillus anthracis* pXO1. *Nucleic Acids Res.* **32**, 977–988 (2004)
60. Raymond B., Bonsall M.B.: Cooperation and the evolutionary ecology of bacterial virulence: the *Bacillus cereus* group as a novel study system. *Bioessays*, **35**, 706–716 (2013)
61. Raymond B., Wyres K.L., Sheppard S.K., Ellis R.J., Bonsall M.B.: Environmental factors determining the epidemiology and population genetic structure of the *Bacillus cereus* group in the field. *PLoS Pathog.* **6**: e1000905 (2010)
62. Schnepf E., Crickmore N., Van Rie J., Lereclus D., Baum J., Feitelson J., Zeigler D.R., Dean D.H.: *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 775–806 (1998)
63. Setlow P.: I will survive: DNA protection in bacterial spores. *Trends Microbiol.* **15**, 172–180 (2007)
64. Slamti L., Lereclus D.: A cell-cell signaling peptide activates the PlcR virulence regulon in bacteria of the *Bacillus cereus* group. *EMBO J.* **21**, 4550–4559 (2002)
65. Sonenshein A.L.: Control of sporulation initiation in *Bacillus subtilis*. *Curr. Opin. Microbiol.* **3**, 561–566 (2000)
66. Stenfor Arensen L.P., Fagerlund A., Granum P.E.: From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**, 579–606 (2008)
67. Svensson B., Ekelund K., Ogura H., Christiansson A.: Characterization of *Bacillus cereus* isolated from milk silo tanks at eight different dairy plants. *Int. Dairy J.* **14**, 17–27 (2004)
68. Świąćicka I.: Natural occurrence of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* in eukaryotic organisms: a case for symbiosis. *Biocontrol Sci. Tech.* **18**, 221–239 (2008)
69. Świąćicka I., Bartoszewicz M., Kasulyte-Creasey D., Drewnowska J., Murawska E., Yernazarova A., Łukaszuk E., Mahillon J.: Diversity of thermal ecotypes and potential pathotypes of *Bacillus thuringiensis* soil isolates. *FEMS Microbiol. Ecol.* **85**, 262–272 (2013)
70. Ulu N.N., Tezcan E.F.: Cold shock proteins. *Turk. J. Med. Sci.* **31**, 283–290 (2001)
71. Vos M., Didelot X.: A comparison of homologous recombination rates in bacteria and archaea. *The ISME J.* **3**, 199–208 (2009)
72. Wouters J.A., Rombouts F.M., Kuipers O.P., de Vos W.M., Abee T.: The role of cold-shock proteins in low-temperature adaptation of food-related bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* **23**, 165–173 (2000)
73. Zwick M.E., Read T.D. i wsp.: Genomic characterization of the *Bacillus cereus* sensu lato species: backdrop to the evolution of *Bacillus anthracis*. *Genome Res.* **22**, 1512–1524 (2012)