

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky**



**Biologická aktivita bakterií skupiny *Bacillus cereus***

**Diplomová práce**

**Bc. Marta Rozumová**

**Výživa a potraviny**

**Ing. Hana Šubrtová Salmonová, Ph.D.**

© 2020 ČZU v Praze

## Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Biologická aktivita bakterií skupiny *Bacillus cereus*" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 23. 7. 2020 \_\_\_\_\_

## **Poděkování**

Děkuji Ing. Haně Šubrtové Salmonové, Ph.D. za věnovaný čas, trpělivost, precizní vedení a celkově obohacující spolupráci během tvorby této práce.

# Biologická aktivita bakterií skupiny *Bacillus cereus*

## Souhrn

Bakterie skupiny *B. cereus* jsou známé hlavně pro své patogenní působení v potravinách. Tato skupina ale zahrnuje několik rozličných druhů s různou biologickou aktivitou, která ovlivňuje mikroorganismy, rostliny i živočichy. Ať už je to *B. anthracis*, který způsobuje smrtelně vážná onemocnění, nebo *B. mycoides*, který je spojován s podporou růstu rostlin, či *B. thuringiensis*, který je komerčně využíván pro svou insekticidní aktivitu.

Cílem diplomové práce bylo testování antimikrobiální aktivity, patogenního potenciálu a potenciálu pro inhibici quorum sensing bakterií skupiny *B. cereus* izolovaných z potravin a krmiv. Antimikrobiální aktivita byla testována pomocí jamkové agarové difuzní metody proti třem indikátorovým kmenům: *B. cereus*, *Listeria monocytogenes* a *Clostridium perfringens*. Testování patogenního profilu a potenciálu pro inhibici quorum sensing probíhalo sledováním přítomnosti jednotlivých toxinových genů a genů pro inhibici quorum sensing. K tomuto účelu byla použita metoda PCR. Pomocí agarové kultivační metody byla také provedena zkouška lécitinázové a hemolytické aktivity.

Antimikrobiálně aktivních nebylo mnoho kmenů, nejčastěji však byly aktivní proti samotnému *B. cereus*. Hemolytická i lécitinázová aktivita byla potvrzena u všech kmenů. Pomocí metody PCR byla prokázána 100% přítomnost genů pro nehemolytický enterotoxin, cereolyzin O, hemolyzin III, fosfolipázu C, fosfolipázu fosfatidilcholin preferující a sfingomyelinázu. To ale nemusí nutně znamenat, že se tyto geny ve skutečnosti projeví. Exprese genů je závislá hlavně na prostředí a vnějších podmínkách. Sledována byla také přítomnost ostatních, méně prevalenčních, toxinových genů, mezi které patří Immune inhibitor A a cereulid. Geny pro tyto toxiny nenesl žádný z testovaných kmenů. Stejně tak nebyla pozorována přítomnost genů pro hemolyzin BL. Schopnost inhibovat quorum sensing neměl téměř žádný z testovaných kmenů.

Patogenní působení bakterií skupiny *B. cereus* je v souvislosti s potravinami často zmiňovaným problémem. Jejich potenciál ale tkví v antimikrobiální aktivitě proti jiným patogenním bakteriím, která by se dala využít ve farmaceutickém i potravinářském průmyslu. Produkovány jsou jak bakteriociny, tak antibiotika. Antimikrobiální aktivita je nejvyšší proti blízce příbuzným druhům, ale může působit i proti jiným podobným grampozitivním patogenním bakteriím vyskytujícím se v potravinách. Další výhodnou vlastností těchto bakterií je také schopnost narušit buněčnou komunikaci, a to díky působení AHL-laktonázy. Tento mechanismus může zabránit působení konkurenčních, často patogenních, bakterií v hostiteli a znemožnit tak vznik infekce. V budoucnu by méně patogenní druhy, jako je např. *B. mycoides*, mohly částečně nahradit komerční antibiotika.

**Klíčová slova:** *Bacillus cereus*, emetický toxin, enterotoxiny, hemolyziny, antimikrobiální aktivita, bakteriocin

# Biological activity of *Bacillus cereus* group

## Summary

Bacteria of *Bacillus cereus* group are mainly associated with food poisoning. However, this group includes several different species with various biological activity that affects microorganisms, plants and animals. Whether it is *B. anthracis* which causes fatal diseases or *B. mycoides* which is associated with promoting plant growth or *B. thuringiensis* which is commercially used as an insecticide.

The aim of the diploma thesis was to test the antimicrobial activity, pathogenic potential and potential for quorum sensing inhibition of *B. cereus* bacteria isolated from food a feed. Antimicrobial activity was tested by using the agar diffusion method against three indicator strains *B. cereus*, *Listeria monocytogenes* and *Clostridium perfringens*. By monitoring the presence of certain toxin genes and genes for quorum sensing inhibition the pathogenic profile and potential for quorum sensing inhibition was determined. For this purpose, the PRC method was used. An assay for lecithinase and hemolytic activity was also performed using an agar plate method.

Most of the strains were not antimicrobial active, most often activity was recognized against *B. cereus* itself. Hemolytic and lecithinase activity was confirmed in all strains. Using the PRC method, 100 % presence of genes for non-hemolytic enterotoxin, cereolysin O, hemolysin III, phospholipase C, phosphatidilcholin preferred phospholipase and sphingomyelinase was confirmed. However, this does not necessarily mean, that these genes will manifest. Gene expression depends mainly on the environment and external conditions. The presence of other less prevalent toxin genes was also monitored, including cereulide and Immune inhibitor A. None of the tested strains carried the genes for these toxins. Likewise, no genes for hemolysin BL were observed. Almost none of the tested strains had the ability to inhibit quorum sensing.

The pathogenic activity of *B. cereus* is frequently mentioned problem associated with food. Nevertheless, they have great potential for their antimicrobial activity against other pathogens, which could be used in the pharmaceutical and food industries. Bacteriocins and also antibiotics are produced by these bacteria. Their antimicrobial activity is highest against closely related species but may also act against other similar gram-positive pathogenic bacteria occurring food. Another advantageous property of these bacteria is also the ability to disrupt cell communication due to the action of AHL-lactonase. This mechanism can prevent other competitive and pathogenic bacteria from acting in the host and prevent the formation of infection. In the future, less pathogenic species such as *B. mycoides* could partially replace commercial antibiotics.

**Keywords:** *Bacillus cereus*, emetic toxin, enterotoxins, hemolysins, antimicrobial activity, bacteriocin

# Obsah

<b>1 Úvod .....</b>	<b>7</b>
<b>2 Vědecká hypotéza a cíle práce .....</b>	<b>8</b>
<b>3 Literární rešerše.....</b>	<b>9</b>
3.1 Charakteristika skupiny <i>Bacillus cereus</i> .....	9
3.1.1 Prostředí a patogenita .....	11
3.1.2 Druhy .....	12
3.2 Patogenní potenciál .....	15
3.2.1 Onemocnění z potravin.....	15
3.2.2 Faktory virulence .....	16
3.2.3 Další onemocnění .....	23
3.3 Antimikrobiální aktivita.....	24
3.3.1 Bakteriociny.....	25
3.3.2 Antibiotika .....	27
3.3.3 Insekticidní aktivita .....	28
3.3.4 Buněčná komunikace.....	29
3.4 Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	31
<b>4 Metodika .....</b>	<b>33</b>
4.1 Zkouška hemolytické a lecitinázové aktivity .....	34
4.2 Stanovení antimikrobiální aktivity .....	35
4.3 Stanovení patogenního profilu a potenciálu QQ.....	36
<b>5 Výsledky.....</b>	<b>40</b>
5.1 Zkouška hemolytické a lecitinázové aktivity .....	40
5.2 Stanovení antimikrobiální aktivity .....	40
5.3 Stanovení patogenního profilu a potenciálu QQ.....	42
<b>6 Diskuze .....</b>	<b>44</b>
<b>7 Závěr .....</b>	<b>48</b>
<b>8 Literatura.....</b>	<b>49</b>
<b>9 Seznam použitých zkratk a symbolů .....</b>	<b>69</b>

# 1 Úvod

Bakterie skupiny *Bacillus cereus* jsou přirozenými obyvateli půdy. Jedná se o velice odolné bakterie, protože mají schopnost vytvářet spory. Díky nim jsou podmínky pro jejich přežití velmi univerzální. Odolávají výrazným teplotním změnám i suchu (Messelhäusser et al. 2014). Díky adhezivním sporám se snadno dostanou do potravinářského prostředí a dále se potom šíří i do velkého spektra potravin (Wijman et al. 2007). Při styku se savčími tkáněmi jsou bakterie skupiny *B. cereus* oportunními patogeny. Vytvářejí několik virulentních faktorů, které mohou u lidí způsobit řadu nepříjemných onemocnění (Kotiranta et al. 2000). Proto jsou považovány za jedny z nejvýznamnějších patogenů přenášených potravinami a musí být kontrolovány v každém stupni výroby a zpracování potravin (Ramarao et al. 2015). Skupina zahrnuje několik druhů, lišící se svými vlastnostmi. Z toho důvodu je spektrum toxicity *B. cereus sensu lato* široké, pohybuje se od mírné nebo žádné toxicity až po vysoce toxické kmeny, o nichž bylo hlášeno, že jsou zodpovědné za úmrtí (Dierick et al. 2005). Právě kmeny nevykazující žádný stupeň toxicity mohou být užitečné díky svým antimikrobiálním a antibiotickým vlastnostem (Abriouel et al. 2011; Jacques 2011).

## 2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Hypotéza: Kmeny *Bacillus cereus sensu lato*, izolované z různých potravin, budou produkovat odlišné typy toxinů v závislosti na druhu potraviny. Dále předpokládáme, že některé z izolovaných kmenů budou mít schopnost inhibovat růst blízké příbuzných druhů bakterií.

Cílem diplomové práce je stanovení toxigenního profilu bakterií skupiny *Bacillus cereus*, a testování jejich antimikrobiální aktivity.



## 3 Literární rešerše

### 3.1 Charakteristika skupiny *Bacillus cereus*

Skupinu *Bacillus cereus* tvoří bakterie patřící do kmene Firmicutes, třídy Bacilli, řádu Bacillales, čeledi Bacillaceae, rodu *Bacillus*. Skupina zahrnuje nejméně 7 blízce příbuzných druhů: *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. cytotoxicus* a *B. toyonensis* (Liu et al. 2015). Přestože rod *Bacillus* obsahuje nejméně 136 druhů, hlavní patogenní potenciál má právě skupina *Bacillus cereus*.

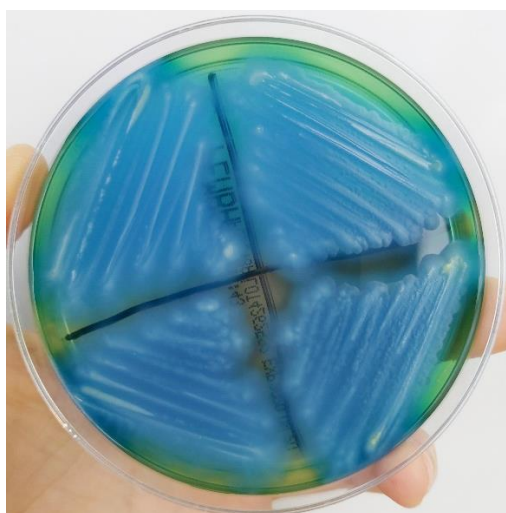
*Bacillus cereus sensu lato* jsou sporulující bakterie, jejichž struktura vegetativních buněk a spor se mezi druhy skupiny *B. cereus* příliš neliší. Buňky jsou ve tvaru rovných nebo mírně zakřivených tyčinek (Logan & De Vos 2009) o velikosti 1,0 – 1,2 µm x 3,0 – 5,0 µm (Kramer & Gilbert, 1989). Tyčinky se vyskytují jednotlivě nebo ve dvojicích, některé také v řetězcích (ve kterých hranaté konce buněk těsně přiléhají) a příležitostně mohou tvořit dlouhá vlákna. Rozdíly v délce řetězku jsou dány fází růstu a prostředím (Bottone 2010). V každé buňce se tvoří pouze jedna endospora, která je velice odolná vůči mnoha nepříznivým podmínkám (Logan & De Vos 2009). Velikost spor a morfologie se mohou mezi kmeny stejného druhu lišit, ale většina kmenů produkuje spory s průměrnou velikostí 1 µm (Bottone 2010). Buňky jsou zpravidla grampozitivní. Některé bakterie jsou schopny pohybu, který zajišťuje bičík. Většina druhů je fakultativně anaerobní (Logan & De Vos 2009). Optimální teplota pro růst vegetativních buněk se pohybuje v rozmezí 30–40 °C, maximální teplota v rozmezí 48–55 °C. Při teplotách méně než 10 °C se obvykle nemnoží. Výjimkou jsou psychrotolerantní kmeny, které se dokážou množit i při teplotě 4 °C. Optimální pH pro růst *B. cereus* je 4,3–9,3 (Chorin et al. 1997; de Vries et al. 2004). Jako zdroj uhlíku jim slouží glukóza (nikoliv mannitol, arabinóza nebo xylóza), hydrolyzují škrob i želatinu a jsou rezistentní vůči ampicilinu. Většina kmenů vykazuje také hemolytickou a lecitinázovou aktivitu (Vilas-Bôas et al. 2007).

Tyto bakterie rostou na běžně používaných médiích, jako jsou živný nebo krevní agar. Morfologie kolonií a jejich velikost je mezi jednotlivými druhy i v rámci druhu velice variabilní (Logan & De Vos 2009). Latinský název může vypovídat o typické morfologii buněk *B. cereus* pod mikroskopem a koloniích na miskách s krevním agarem. Slovo „*Bacillus*“ znamená tyčinka, slovo „*ceruus*“ může být z latiny přeloženo jako voskový. Na agaru tyto bakterie vytváří typické velké kolonie (průměr 3–8 mm) v šedé voskovité barvě s nepravidelnými okraji (Kramer & Gilbert, 1989). Primárním selektivním činidlem pro stanovení *B. cereus* je polymyxin B. Na médiu obsahujícím vaječný žloutek produkují všechny druhy ve skupině neprůhledné zóny obklopující kolonie nebo fosfatidylcholin v důsledku působení lecitinázy. Na rozdíl od mnoha druhů *Bacillus*, *B. cereus* nefermentuje mannitol, což je charakteristika využívaná v různých diferenciativních médiích (van Netten & Kramer 1992). V potravinářství se nejčastěji používá pro identifikaci *B. cereus* selektivní agar MYP (Mannitol Yolk Polymyxine), který je daný normou ČSN EN ISO 7932 (2005). Na Obrázku č. 1 jsou zobrazené typické narůžovělé kolonie tvořící zónu precipitace. Dalším hojně využívaným selektivním agarem je

PEMBA (Polymyxin pyruvate egg-yolk mannitol–bromothymol blue agar), na kterém se *B. cereus* projevuje tvorbou modrých kolonií (Teramura et al. 2019), zobrazeno na Obrázku č. 2.



**Obrázek č. 1:** Kolonie *B. cereus*, které byly izolovány ze sušených syrovátků, na MYP agaru po 48h aerobní kultivaci při teplotě 30 °C (vlastní foto).



**Obrázek č. 2:** Kolonie *B. cereus* na PEMBA agaru po 24h aerobní kultivaci při teplotě 37 °C (vlastní foto).

## Spory

Spory *B. cereus sensu lato* jsou umístěny elipsoidně, centrálně nebo paracentrálně, a mateřské buňky nerozšiřují (Gilbert & Kramer, 1986). Stavba je srovnatelná se sporama jiných druhů *Bacillus*. Vnitřní oddělení spory neboli jádro obsahuje DNA. DNA je uložena s kationty a pyridin-2,6-dikarboxylovou kyselinou v chelátu s dvojmocnými ionty vápníku, které slouží k udržení klidového stavu spor a zvyšují odolnost vůči látkám poškozujícím DNA. Jádro je obklopeno vnitřní membránou, jejíž součástí jsou germinantní receptory. Ty v příznivých podmínkách iniciují signální transdukční dráhu, která vede k růstu spory a vegetativnímu buněčnému stavu (Swick et al. 2016). Látky podněcující proces klíčení mohou být u *B. cereus sensu lato* různé podskupiny cukrů, aminokyseliny a ribonukleosidy a další malé molekuly v závislosti na druhu (Moir 2006). Vnitřní membránu dále obklopuje obal peptidoglykanu, který obsahuje dvě podvrstvy, kůru a zárodečnou vrstvu. Kůra ohraničuje objem jádra a udržuje jej v suchu. Zárodečná vrstva je aktivní při růstu spor. Vnější vrstvu spory tvoří plášť obsahující

přibližně 70 proteinů uspořádaných ve vrstvách, aby podpořily pružnost struktur (Swick et al. 2016).

Na sporu těsně přiléhá exosporium, které se skládá z krystalické bazální vrstvy. Složení a funkce exosporia není dostatečně prozkoumáno (Swick et al. 2016). Je známo, že exosporium tvoří bariéru proti specifickým chemickým látkám a také chrání před oxidem dusnatým (Ball 2008).

### **Bičíky**

*B. cereus* je pohyblivá bakterie nesoucí bičíky. Většina izolovaných kmenů je schopna pohybu v tekutých médiích tzv. swimming (Ghelardi et al. 2007). Bičík *B. cereus* má také adhezivní funkci a podporuje tak stabilní interakce mezi bakterií a epiteliálními buňkami (Ramarao & Lereclus 2006).

Bičíky jsou také podstatné pro kolektivní průnik bakterií skrz pevné povrchy a to pomocí tzv. rojové motility (Salveti et al. 2007). Jedná se o specializovanou formu povrchové translokace, při které specifické buňky reagují na kontakt s povrchem a iniciují produkci vysoce diferenciatálních hemžících se buněk (Harshey 2003). Tyto buňky jsou delší, mají větší počet bičíků a mají schopnost kooperativně se pohybovat napříč různými druhy povrchů, včetně sliznic. Tato schopnost rojení podporuje rychlejší invazi do tkání hostitele, může mít vliv na interakci hostitel-patogen a často vede ke zvýšené produkci specifických virulentních faktorů. Byla potvrzena spojitost vzniku těchto diferenciovanych buněk s významně vyšší mírou sekrece hemolyzinu BL (Hbl) (Ghelardi et al. 2007).

### **3.1.1 Prostředí a patogenita**

Jak již bylo výše zmíněno, většina druhů *Bacillus* má malý nebo žádný patogenní potenciál a zřídka jsou spojovány s onemocněním lidí či zvířat. Velkou výjimku tvoří právě skupina *Bacillus cereus* (*Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*), které mohou být pro člověka patogenní. Hlavní roli v jejich patogenitě hrají již zmiňované odolné spory. Odolnost spor vůči teple, UV záření, dezinfekčním prostředkům a vysychání vede k tomu, že druhy jsou problematickými kontaminanty ve farmaceutických produktech, potravinách a ve zdravotním prostředí (chirurgické obvazy, operační sály) (Logan & De Vos 2009).

*Bacillus cereus sensu lato* je popsán jako všudypřítomná bakterie, v přírodě jej lze nalézt v různých typech půd, sedimentech, prachů a na povrchu rostlin (Gilbert & Kramer, 1986; Kramer & Gilbert, 1989; Kotiranta et al. 2000; Schoeni & Wong, 2005). Přítomnost *B. cereus* ve vodním prostředí je spekulována. (Østensvik et al. 2004). Z několika řek byly izolovány spory a je možné, že zásobování vodou může být jedním z prostředků, kterými *B. cereus* vstupuje do potravinového řetězce (Stenfors Arnesen et al. 2008).

Bakterie mohou přežívat v neaktivním stavu velice dlouhou dobu, což ztěžuje objasnění jejich primárních ekologických nik (prostředí). Spory se mohou šířit pasivně a vyskytovat se mimo přírodní stanoviště (Messelhäusser et al. 2014). Fakt, že *B. cereus* může v půdě klíčit, růst a sporulovat, poukazuje na saprofytický životní cyklus (Vilain et al. 2006; Brézillon et al. 2015). Ačkoliv celý životní cyklus *B. cereus* probíhá v půdě, je tato bakterie také přizpůsobena

životnímu stylu v hostiteli, kde působí jako patogen nebo jako komensální součást střevní mikrobioty. *B. cereus* byl pozorován ve stolici zdravých lidí a hospodářských zvířat (Kramer & Gilbert, 1989; Jensen et al. 2003). Často také bývá izolován ze střev hmyzu, různých druhů členovců, a existuje možnost, že bakterie funguje se svým bezobratlým hostitelem v symbióze (Margulis et al. 1998). Přizpůsobení na střevní prostředí by mohlo souviset s možným negativním dopadem na zdraví hostitele. Uvádí se, že všechny kmeny *B. cereus* jsou schopny produkovat alespoň jeden z toxinů související s průjmovým onemocněním (Hong et al. 2005). Některé kmeny ale při teplotě 37 °C produkují pouze zanedbatelné množství toxinu a Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA) povolil jejich použití jako probiotika (Margulis et al. 1998).

Optimální teplota pro tepelnou aktivaci klíčení spor je 65–75°C. Teplota při pasterizaci mléka je podobná. Kombinace tepelné odolnosti spor a psychrotrofních charakteristik představuje hlavní problém při kontrole tohoto organismu (Ramarao et al. 2015). Další vlastností komplikující jejich kontrolu je schopnost bakterií tvořit tzv. exosporium (Kailas et al. 2011), které obsahuje proteiny, lipidy a sacharidy (Sylvestre et al. 2002). Protože je silně hydrofobní, umožňuje exosporium přilnout k inertním povrchům a komplikuje tak čištění průmyslových a jiných zařízení (Faille et al. 2007).

Studie genomu a fyziologie ukazují, že na rozdíl od skutečných půdních mikroorganismů mají bakterie skupiny *B. cereus* malý počet genů způsobujících degradaci sacharidových polymerů. Naopak, tyto druhy mají široké spektrum genů kódujících extracelulární faktory, jako jsou degradační enzymy (fosfolipázy, proteázy a chitinázy), cytotoxické proteiny (hemolyziny, enterotoxiny a cytotoxiny) a membránové proteiny (Gohar et al. 2008). Tyto vlastnosti udělují bakteriím skupiny *B. cereus* patogenní status (Raymond et al. 2010). Podle EFSA drží *B. cereus* v Evropské unii čtvrté místo jako příčina onemocnění z potravin (EFSA 2016).

### 3.1.2 Druhy

#### *Bacillus anthracis*

*B. anthracis* je etiologickým činitelem onemocnění zvaného antrax. Toto onemocnění je primárně chorobou býložravců a dříve se jednalo o nejvýznamnější příčinu úmrtí skotu, ovcí, koní a koz ve světě (Logan & De Vos 2009). Byl pojmenován v roce 1975 německým biologem Ferdinandem Cohnem (Cohn 1876). Slovo „anthrax“ je odvozeno od řeckého anthrakos, které znamená uhlí. Tento název odráží vzhled charakteristického strupu, který se tvoří při kožní formě (Turnbull 2002). Výzkum této bakterie přinesl na konci 19. století časný průlom pro mikrobiologii a očkování (Koch 1876; Pasteur 1881). Účinná veterinární vakcína začala být dostupná na konci 30. let (Logan & De Vos 2009). První živou bakteriální vakcínou byl atenuovaný kmen *B. anthracis* (Koch 1876; Pasteur 1881).

Nemoc je přenosná také na člověka. Může se projevovat ve třech formách: plicní, střevní a kožní, a často končí úmrtím. I nadále se onemocnění vyskytuje v několika zemích Afriky a Asie, zejména v těch, kde nemají účinnou očkovací politiku. Častou příčinou nákazy jsou kontaminované živočišné produkty a místa jejich zpracování. Po vniknutí spor do těla, pronikají

spory do lymfatické tkáně a sleziny, ale mohou se dostat i do trávicího traktu, tam vyklíčí, pomnoží se a vegetativní buňky produkují velké množství toxinů. Toxiny způsobují fatální septikémii, tvoří se hemoragické exsudáty, které unikají z úst, nosu a konečníku. Spory pak zůstávají životaschopné v půdě po mnoho let (Logan & De Vos 2009). Více o toxinech *B. anthracis* je uvedeno v kapitole 3.2.3.2 Toxiny *B. anthracis*.

*B. anthracis* je dlouhodobě považován za potenciální biologickou zbraň. Předpokládá se, že jeho první použití bylo směřováno na hospodářská zvířata během první světové války (Barnaby 2002). Od té doby se stal součástí útočných programů v několika zemích (Mangold & Goldberg 1999; Mikkola et al. 2000) a byl použit také při teroristických útocích (Lane & Fauci 2001). Lidé jsou proti antraxu jen nepatrně více rezistentní než býložravci, infekční dávky v lidské plicní a střevní formě jsou ale obecně vysoké (LD<sub>50</sub> činí 2,500 až 55,000 spor) (Takahashi et al. 2004).

### ***Bacillus cereus***

*B. cereus* je po *B. anthracis* hned druhým nejvýznamnějším patogenem, který způsobuje onemocnění přenášeného potravinami a oportunní infekce (Logan & De Vos 2009). Typový kmen *B. cereus sensu stricto* byl izolován ze vzduchu v kravské stáji před více než sto lety (Frankland & Frankland 1887).

Od druhé poloviny 20. století byl *B. cereus* uznáván za běžného kontaminanta potravin způsobujícího alimentární otravy. V poslední době je ale *B. cereus* také považován za etiologického původce lokalizovaných infekcí ran, očí a systémových infekcí (Ehling-Schulz et al 2011). V 50. letech 20. století byly popsány dva typy onemocnění, které byly na základě průvodních jevů nazvány jako emetický a průjemový syndrom (Stenfors Arnesen et al. 2008). Obecně jsou onemocnění *B. cereus* považována za důsledek exprese toxinů. V poslední době je ale diskutováno několik exoproteinů s enzymatickou aktivitu (proteázy a fosfolipázy), které by mohly k průjemovým otravám přispívat (Doll et al. 2013). Blíže viz kapitola 3.2.2 Faktory virulence.

V některých případech je naopak *B. cereus* připsán pozitivní vliv. Některé kmeny podporují růst rostlin a potlačují jejich choroby (Dutta et al. 2013). Nedávno bylo publikováno, že kmen *B. cereus* AR156 indikuje systémovou rezistenci vůči *Pseudomonas syringae* u rostliny zvané Huseníček rolní (Wang et al. 2017), což naznačuje, že rhizosféry rostlin představují přirozenou niku (prostředí) pro *B. cereus*.

*Bacillus cereus sensu stricto* zahrnuje všechny kmeny skupiny *B. cereus*, které z důvodu chybějících charakteristických znaků nepatří k žádnému jinému druhu (Stenfors Arnesen et al. 2008).

### ***Bacillus cytotoxicus***

*B. cytotoxicus* vyvolal pozornost ve Francii již v roce 1998 když byl izolován a označen za původce ohniska alimentární nákazy a způsobil tři úmrtí. Izolovaný singulární kmen NHV 391–98T byl nejprve označen jako *B. cereus*. První studie objevily přítomnost průjemového toxinu cytK1 a označily jej za příčinu vysoké toxicity (Lund et al. 2000). Od té doby byly nalezeny další čtyři podobné izoláty, z nichž tři byly také spojeny s ohniskem otravy jídlem.

Společně vykazovaly fenotypové a genetické rozdíly vůči jiným kmenům *B. cereus* (Fagerlund et al. 2007; Afchain et al. 2008; Auger et al. 2008; Rau et al. 2009), a proto byl ustanoven samostatný druh skupiny *B. cereus*, *Bacillus cytotoxicus* (Guinebretière et al. 2013).

*B. cytotoxicus*, se mimo jiné odlišuje od ostatních svou malou velikostí chromozomu 4.085 Mb (Lapidus et al. 2008), jedná se o termotolerantní druh, který může růst až do teploty 50 °C (Guinebretière et al. 2013).

### ***Bacillus mycoides***

Ze skupiny *B. cereus* je *B. mycoides* pravděpodobně nejméně předmětem zájmu a zkoumání. Na rozdíl od *B. anthracis* a *B. cereus sensu stricto* není považován za patogenní a nemá insekticidní aktivitu (jako například *B. thuringiensis*). Na agarových plotnách tvoří *B. mycoides* jedinečné rhizoidní kolonie s řetězci buněk vytvářejícími vlákna (Di Franco et al. 2002). *B. mycoides* je přítomen v půdě a obzvlášť v rhizosféře rostlin. Některé izoláty vykazují vysokou schopnost fixace vzdušného dusíku, která podporuje růst rostlin, včetně slunečnice (Ambrosini et al. 2016), okurky (Neher et al. 2009) a cukrové řepy (Bargabus et al. 2002).

*B. cereus* byl původně popisován jako mezofilní organizmus, který roste při teplotách 10–50 °C, přičemž optimální teplota se pohybuje mezi 30–40 °C (Claus & Berkeley, 1986). V posledních letech se navýšilo množství detekovaných psychrotolerantních kmenů, což vedlo k popisu nového psychrotolerantního druhu v rámci skupiny *B. cereus*, pod jménem *B. weihenstephanensis*. Optimální teplota pro růst *B. weihenstephanensis* je stejná jako u ostatních mezofilních druhů a pohybuje se mezi 25 a 35 °C, tento druh se ale odlišuje svou schopností růst i při nízkých teplotách, kolem 4 °C (Lechner et al. 1998). U některých kmenů *B. weihenstephanensis* byla zjištěna produkce cereulidu, a to už při teplotě 8 °C. V souvislosti s ním nebyla doposud pozorována žádná průjmová onemocnění (Bhunia 2018). Na základě genomové sekvenace, fyziologických, metabolických a chemotaxonomických znaků byl *B. weihenstephanensis* v roce 2018 reklasifikován a zařazen pod druh *B. mycoides* (Liu et al. 2018).

### ***Bacillus pseudomycoides***

*B. pseudomycoides* byl odlišen od *B. mycoides* a pojmenován L. K. Nakamurou v roce 1998. Fenotypický projev je velice podobný *B. mycoides*, ale geneticky a složením mastných kyselin se odlišuje (Nakamura 1998). U kmene DSMZ 12442 byl nalezen gen pro bakteriocin zvaný pseudomycoicidin, díky kterému je *B. pseudomycoides* schopen působit antimikrobiálně proti grampozitivním bakteriím (Basi-Chipalu et al. 2015).

### ***Bacillus thuringiensis***

*B. thuringiensis* byl poprvé izolován v roce 1901 v Japonsku z infikovaných larev bource morušového. Bakterie byla označena za původce sotto choroby (onemocnění náhlého kolapsu). Svůj název získala podle německé provincie, kde ji ze zavíječe moučného izoloval Ernst Berliner (Berliner 1915). *B. thuringiensis* je velice populárním biopesticidem pro hubení škůdců, viz kapitola 3.3.3 Insekticidní aktivita.

Hoton et al. (2009) shledává, že *B. thuringiensis* může také nést potenciální enterotoxické geny. Gen cereulidu zatím nebyl u *B. thuringiensis* nalezen, ačkoli bylo provedeno systematické hodnocení u více než 200 kmenů (Hoton et al. 2009). Dvě studie Jackson et al. (1995) a McIntyre et al. (2008) referují o účasti *B. thuringiensis* při onemocněních pocházejících z potravin. První popisuje jedno ohnisko onemocnění, druhá hodnotí izoláty z 39 ohnisek. V obou studiích byl *B. thuringiensis* navrhnout jako příčina infekcí.

### ***Bacillus toyonensis***

*B. toyonensis* byl do skupiny *B. cereus* zařazen v roce 2013. Kmen BCT-7112, do roku 2013 identifikovaný jako *B. cereus* var. *toyoi*, je jeho typovým kmenem (Jiménez et al. 2013a). Jedná se o probiotický kmen vytvářející spory, který se využívá od roku 1975, kdy byl oficiálně schválen japonským ministerstvem zemědělství a lesnictví jako komerční přípravek TOYOCERIN®. Toyocerin je přípravek životaschopných spor, který se používá jako probiotický mikroorganismus u zvířat, podporující růst a trávení (Williams et al. 2009; Oren & Garrity 2014). Spory BCT-7112T se používají ve výživě prasat, drůbeže, skotu a v akvakultuře více než třicet let v celé řadě zemí světa. Evropská komise jej poprvé povolila v roce 1994 a stal se tak prvním mikroorganizmem povoleným jako doplněk krmiva v Evropské unii (Hong et al. 2005; Williams et al. 2009).

*B. toyonensis* byl izolován z půdy. V genomu *B. toyonensis* jsou přítomny pouze tři ze sedmi genů kódujících cereulid syntetázu. Proto se neočekává, že by tento enzym byl zodpovědný za syntézu emetického syndromu. Gen kódující cytotoxický enterotoxin K v genomu chybí úplně (Jiménez et al. 2013b). Nehemolytický a hemolytický toxin v genomu kódovány jsou, ale většinou se neprojevují. Nicméně jsou předmětem dalšího bádání, aby se toxinogenní potenciál mohl úplně vyloučit (Abdulmawjood et al. 2019).

## **3.2 Patogenní potenciál**

### **3.2.1 Onemocnění z potravin**

*B. cereus* lze izolovat z pozoruhodné řady potravin a potravinových surovin včetně rýže, mléčných výrobků, koření, sušených potravin a zeleniny (Kramer & Gilbert, 1989). Do oblastí výroby se dostávají skrze primární suroviny, získané na poli či v sadu. Jak již bylo zmíněno, tato skupina je běžným kontaminantem mléka a může v mléčných výrobcích způsobit vadu známou jako sladké srážení. Spory nebo buňky mohou během pastvy kontaminovat vemena krav, nebo se do prostředí mléčné produkce dostanou pomocí podestýlky či krmiva (Kramer & Gilbert 1989; Magnusson et al. 2007). Křížová kontaminace pak umožňuje distribuovat *B. cereus* i do jiných potravin, jako jsou masné výrobky (Granum 2007).

Bakterie *B. cereus* jsou schopné tvořit biofilm, díky kterému jsou odolné vůči sanitacím prostředkům a který zvyšuje perzistenci spor v prostředí. Často zůstávají v mlékárenském potrubí, jelikož dokážou dobře přilnout k povrchu (Wijman et al. 2007). Pro uskladnění potravin, a zvláště mléčných výrobků se používají nízké teploty, které znevýhodňují méně konkurenceschopné bakterie. *B. weihenstephanensis*, *B. cereus* i některé další druhy *Bacillus*

v těchto teplotách dokážou přežít a množit se, a proto jsou také z mléčných výrobků často izolovány. Kromě mléčných výrobků představují příznivé prostředí pro *B. cereus* šetrně tepelně upravené potraviny s prodlouženou dobou skladování (Larsen & Jørgensen, 1999).

S ohledem na všudypřítomnost bakterií této skupiny, zvláště jejich odolných spor, nelze obecně vyloučit riziko kontaminace u potravin s pH vyšším než 4,8. Pokud spotřebitelé nebudou dodržovat základní pravidla pro skladování potravin nebo přípravu pokrmů (zamezit pomalému zchlazování, skladování při pokojové teplotě, dlouhodobému udržování potravy při teplotě 60 °C), může dojít k pomnožení *B. cereus* a následnému rozvoji onemocnění (Stenfors Arnesen et al. 2008).

Patogenita *B. cereus* je založena na celé řadě virulentních faktorů, které ještě nebyly zcela pochopeny a způsobují řadu lidských chorob. Známé jsou otravy z jídla, které mohou způsobit průjem nebo zvracení (Stenfors Arnesen et al. 2008). Syndrom způsobující průjem je důsledkem působení několika enterotoxinů, které vznikají jako produkt metabolismu vegetativních buněk v tenkém střevě, po vyklíčení spor přítomných v kontaminované potravě. Syndrom vyvolávající zvracení (emetický syndrom) je způsoben jediným depsipeptidovým toxinem, cereulidem. K vyvolání onemocnění dochází po požití potravy, ve které již byl cereulid přítomen. Jedná se tedy o intoxikaci (Ehling-Schulz et al. 2005a). Tato onemocnění gastrointestinálního traktu jsou životu nebezpečná pouze ve výjimečných případech. Obecně je patogenní potenciál kmenů *B. cereus* velmi variabilní, některé kmeny nevykazují žádnou cytotoxickou aktivitu, některé jsou naopak vysoce cytotoxické (Jeßberger et al. 2015). Kromě rozdílů v patogenním potenciálu jednotlivých kmenů je virulence ovlivněna také faktory prostředí (Jeßberger et al. 2017).

### 3.2.2 Faktory virulence

Toxiny představují jeden z hlavních faktorů patogenity ve skupině *B. cereus*. Většina druhově specifických toxinů je kódována na plazmidech (pXO plazmidy *B. anthracis* a Cry plazmidy *B. thuringiensis* a cereulid), další toxiny skupiny *B. cereus* jsou kódovány na chromozomech (hemolytické toxiny) (Roux 1888; Lindbäck et al. 2004; Fagerlund et al. 2007).

#### 3.2.2.1 Emetický toxin Cereulid

Cereulid, emetický toxin, je cyklický dodekadepsipeptid se strukturou podobnou draselnému ionoforu valinomycinu (Agata et al. 1995; Isobe et al. 1995). Molekulová hmotnost cereulidu je 1165 Da a jeho struktura je tvořena třemi opakováními ze 4 aminokyselin [D-O-Leu-D-Ala-D-O-Val-D-Val]<sub>3</sub> (Ehling-Schulz et al. 2004). Díky cirkulární struktuře je cereulid stabilní při vysokých teplotách (121 °C, 2 h) a v kyselém i zásaditém prostředí. Také je odolný vůči štěpení pepsinem i trypsinem. Snadno odolává následným tepelným úpravám a není inaktivován ani při průchodu trávicím traktem (Rajkovic et al. 2008; Frenzel et al. 2011).

Molekula je velmi hydrofobní, díky čemuž je v podstatě nerozpustná ve vodném roztoku. Sklon k vazbě na pevné složky potravin nebo kultivačních médií může vést k podceňování cereulidové aktivity (Szabo et al. 1991).



Cereulid je syntetizován neribozomálně, takzvanou cereulid syntetázou (Ces) kódovanou klastrem genů o délce 24 kb (Ehling-Schulz et al. 2005b). Ces představuje nový typ neribozomálních peptidových syntetáz (Marxen et al. 2015), který je umístěn na plazmidu příbuzném s pXO1 (Ehling-Schulz et al. 2006). Plazmid byl původně pojmenován pBCE4810, ale je označován také jako pCER270 (Rasko et al. 2007).

Mechanismus, kterým cereulid způsobuje zvracení u lidí, nebyl zcela objasněn. Rychlý nástup emetického onemocnění, obvykle 0,5 – 6 hodin po konzumaci jídla, naznačuje, že se jedná o intoxikaci předem vytvořeným toxinem v potravě (Ehling-Schulz et al. 2004). Po uvolnění ze žaludku do dvanáctníku se cereulid váže na 5-HT<sub>3</sub> receptor a následná stimulace aferentního nervu vyvolává zvracení. Bylo prokázáno několik biologických účinků cereulidu. Cereulid se podobně jako valinomycin chová jak ionofor a je schopen vytvářet komplexy s ionty draslíku, sodíku a amonnými ionty. Toxin je schopen inhibovat mitochondriální aktivitu pomocí inhibice oxidace mastných kyselin. Buňky s poškozenou mitochondrií si zachovávají neporušené plazmatické membrány. Toxin tak může pronikat do buňky bez vyvolání zjevných membránových lézí (Mikkola et al. 1999). Tento účinek cereulidu byl ve dvou smrtelných případech příčinou selhání jater (Dierick et al. 2005). Stejně tak může dojít příčinou cereulidu k hromadění tuku v játrech, což bylo potvrzeno pokusem na myších (Yokoyama et al. 1999), k rhabdomyolýze a selhání orgánů (Rajkovic et al. 2008). Také se ukázalo, že cereulid dokáže inhibovat NK buňky lidského imunitního systému tzv. natural killer cells (Paananen et al. 2002). Nedávno byl cereulid spojen s indukcí diabetu, protože je schopen způsobit disfunkci beta buněk (Vangoitsenhoven et al. 2014).

Produkce cereulidu nastává na konci logaritmické fáze buňky, během vegetativního růstu, s nejvyšší produkcí během ranné stacionární fáze. Syntéza cereulidu probíhá v rozmezí teplot 12–37 °C, přičemž nejvyšší produkce byla pozorována v rozmezí 12–22 °C (Hägglom et al. 2002). U dvou psychrotolerantních druhů *B. weihenstephanensis* byla teplota při produkci cereulidu 8 °C (Thorsen et al. 2006). Produkce cereulidu je u každého typu potravin jiná. U vajec, masných výrobků a také u tekutých potravin, jako jsou mléko nebo sójové mléko, byly zjištěny pouze nízké hladiny cereulidu. Naopak u vařených rýže a jídel z mouky bývá produkce cereulidu na vysoké úrovni (Agata et al. 2002). Expresi mohou ovlivňovat faktory prostředí, jako jsou pH, kyslík, teplota a přítomnost specifických aminokyselin (Ehling-Schulz et al. 2004). Zároveň byly pozorovány rozdíly v produkci cereulidu mezi kmeny. Geny *ces* vykazují pouze nízký stupeň heterogenity, a proto se domníváme, že tyto rozdíly jsou způsobeny různou mírou regulace (Rajkovic et al. 2006).

Bylo popsáno 18 různých izoforem cereulidu s cytotoxickým potenciálem, a to od nulového po desetinásobný vzhledem ke klasickému cereulidu (Rajkovic et al. 2008). Pro detekci cereulidu byla použita řada různých metod. Spolehlivá je však pouze metoda analýzy pomocí HPLC-MS (Hägglom et al. 2002). Pro identifikaci potenciálně patogenních kmenů je také vhodná metoda PCR (Fricker et al. 2007).

### 3.2.2.2 Hemolytické toxiny

V rané stacionární fázi produkuje *B. cereus* několik sloučenin (degradační enzymy, cytotoxické faktory a proteiny buněčných membrán), které přispívají k virulenci (Guillemet et al. 2010). Rozvoj onemocnění a klinické příznaky jsou pravděpodobně zprostředkovány synergickými účinky více různých faktorů. Většina těchto proteinů je zodpovědná za degradaci erytrocytů a jsou proto definovány jako hemolyziny (Lund et al. 2000).

Hemolytické toxiny způsobují průjmy. Předpokládá se, že toxiny působí skrze narušení integrity plazmatické membrány epiteliálních buněk v tenkém střevě. *B. cereus* produkuje velké množství toxinů a enzymů, které mohou přispívat k průjmovým onemocněním, a tak je identita enterotoxinů stále nejasná. Tři cytotoxiny: hemolyzin BL (Hbl), nehemolytický enterotoxin (Nhe) a Cytotoxin K (CytK) jsou v současné době považovány za etiologickou agens průjmového onemocnění (Lund et al. 2000). Hbl a Nhe jsou vzájemně příbuzné třísloužkové toxiny, zatímco CytK patří do jednosložkových toxinů. Také bylo popsáno několik dalších proteinových cytotoxinů, hemolyzinů a degradačních enzymů (fosfolipázy, kolagenázy), které mohou potenciálně přispívat k patogenitě a průjmovým onemocněním *B. cereus*. Patří mezi ně cereolysin O, hemolyzin II, hemolyzin III, hemolyzin IV, InhA2, dvě fosfolipázy C a sfingomyelináza (Fedhila et al. 2003; Stenfors Arnesen et al. 2008).

#### Nehemolytický enterotoxin (Nhe)

Třísloužkový enterotoxin Nhe byl poprvé charakterizován v roce 1995 v Norsku po velkém ohnisku alimentární otravy způsobené kmenem NVH 0075/95, který byl ale Hbl negativní, a proto se hledala jiná příčina otravy (Lund & Granum, 1996). Nhe nevykazoval žádnou hemolytickou aktivitu (Moravek et al. 2006). Proto byl původně popisován jako toxin bez hemolytické aktivity, což odpovídá i jeho současnému označení „nehemolytický“. Později se však ukázalo, že Nhe je hemolytický vůči erytrocytům u několika druhů savců (Fagerlund et al. 2008).

Enterotoxin je tvořen proteinovými podjednotkami NheA, NheB a NheC, které jsou kódovány *nhe* operonem. Předpokládá se, že geny kódující Nhe jsou přítomny ve všech známých kmenech skupiny *B. cereus* (Lindbäck et al. 2004; Moravek et al. 2006). Podjednotky jsou vylučovány nezávisle na sobě, ale toxická aktivita je dosažena pouze v přítomnosti všech složek, přičemž nejvyšší účinek byl dosažen při poměru NheA, NheB a NheC 10:10:1. Vyšší koncentrace NheC má za následek snížení toxické aktivity (Lindbäck et al. 2004). Podle Heilkenbrinker et al. (2013) by pro optimální cytotoxicitu měla být koncentrace NheB padesátkrát vyšší než koncentrace NheC. Složky Nhe vyžadují specifický vazebný pořádek. Inhibice syntézy toxinu může spočívat v narušení postupu navázání jednotlivých složek. Zejména zabránění vazby NheA na NheB byl účinný způsob pro dosažení neutralizace toxicity Nhe (Didier et al. 2012).

Cytotoxická aktivita Nhe na epitelových buňkách je charakteristická tvorbou pórů v cytoplazmatické membráně, a následnou koloidní osmotickou lýzou buňky. Dosud nebyl identifikován pro vazbu žádný buněčný receptor. Je možné že Nhe nepotřebuje žádný proteinový nebo sacharidový receptor, protože je schopen sám vytvářet póry v lipidových dvojvrstvách (Fagerlund et al. 2008).

Schopnost produkovat tento toxin se mezi jednotlivými kmeny liší. Kmeny s vysokou produkcí vylučují více než 10 µg Nhe na 1 ml supernatantu, zatímco koncentrace u jiných kmenů může být nižší než 0,1 µg v 1 ml supernatantu. Vysoká koncentrace toxinu způsobuje rychlé usmrcení buněk (Moravek et al. 2006) a je spouštěčem mírného vodnatého průjmu (Stenfors Arnesen et al. 2008). Buněčná odpověď po expozici středním nebo nízkým hladinám není známa (Moravek et al. 2006).

#### Hemolyzin BL (Hbl)

Hemolyzin BL (Hbl) je membránově-lytický systém složený ze tří odlišných proteinů označených jako B, L1 a L2 (Beecher & MacMillan 1991), které jsou vylučovány nezávisle na sobě. Všechny tři jsou ale nezbytné pro biologickou aktivitu (Lindbäck et al. 2004). Tyto proteiny, B, L1 a L2, jsou kódovány hblA, hblD a hblC. Geny jsou uspořádány v transkripčním pořadí hblC, hblD a hblA (Ryan et al. 1997). Tato struktura je velice podobná struktuře hemolyzinu E, který je produkován bakterií *E. coli* (Wallace et al. 2000). Hbl je vylučován přibližně 45–65 % kmenů *B. cereus* (Moravek et al. 2006).

Původně byl purifikován z kmene *B. cereus* F837/76, který byl izolován z pooperační rány (Turnbull et al. 1979). Beecher et al. (1995) zjistili, že Hbl způsobuje hromadění tekutin v králičím tenkém střevě a že vykazuje dermonekrotickou aktivitu, vaskulární permeabilitu, cytotoxickou aktivitu a hemolytickou aktivitu, degradaci oční sítnice, oční nekrózu a zánět. Hbl je považován za jediný silný nekrotizující toxin, který byl u *B. cereus* identifikován, díky čemuž je hlavním kandidátem jako virulentní faktor právě u nekrotizujících infekcí (Callegan et al. 1999). Pokud jde o průjmový potenciál Hbl, ukázalo se, že tento toxin způsobuje rychlou akumulaci tekutin v ligovaných ileálních smyčkách. Jeho účinnost se může blížit účinnosti toxinu cholery a z tohoto důvodu je často považován za primární virulentní faktor *B. cereus* (Beecher et al. 1995).

Všechny tři proteinové složky Hbl se na erytrocyty vážou nezávisle na sobě. Složky spojené s membránou vytváří pro průnik komplex, který díky koloidnímu osmotickému mechanismu způsobuje lýzu membrány. Fenomén paradoxní zóny v krevním agaru je výsledkem inhibice hemolýzy, protože B a L1 se vzájemně inhibují nad prahovou koncentrací. Vazba B je mnohem pomalejší než vazba L1 a L2, hemolýza se tudíž projeví až v určité vzdálenosti od středu (Beecher & Wong 1997; Ceuppens et al. 2011).

#### Hemolyzin I (Cereolyzin O)

Hemolyzin I byl poprvé popsán v roce 1967 a byl původně označován u *B. cereus sensu stricto* jako cereolyzin O (Clo), u *B. thuringiensis* jako thuringiolyzin O (Tlo) a u *B. anthracis* jako anthrolyzin O (Alo) (Shannon et al. 2003).

Clo je tepelně labilní protein, jehož hemolytická aktivita je podmínována cholesterolem (<10 µg/ml) a neutralizována antistreptolyzin-O-globulinem z hyperimunního koňského séra (Bernheimer & Grushoff 1967). Clo vykazuje 57–68% podobnost aminokyselin s perfringolyzinem O (Pfo) a streptolyzinem O, které produkují *Clostridium perfringens* a *Streptococcus pyogenes* (Alouf et al. 2005). Hemolyzin I, produkováný *B. cereus*, lze zařadit do rodiny cholesterol-dependentních cytolyzinů „CDC“ (dříve známých jako thiol-

aktivovaných cytolyzinů). Tyto toxiny sestávají z jediného polypeptidového řetězce s molekulovou hmotností 50 kDa až 80 kDa. Jedná se o protein se čtyřmi doménami bohatý na strukturu  $\beta$ -skládaného listu. Aminokyselinové sekvence těchto proteinů mají celkovou párovou sekvenční podobnost 40–70 %. Tuto podobnost můžeme relativně rovnoměrně sledovat v celé délce molekuly, což naznačuje, že všechny mají podobnou aktivitu a 3D strukturu (Jacobs et al. 1999).

Podmínkou pro cytolytickou aktivitu je přítomnost cholesterolu, která je charakteristická téměř pro všechny živočišné buňky. Clo toxin se váže na cholesterol přítomný v cílových buněčných membránách a ty narušuje vytvářením velkých pórů až do průměru 30 nm (Palmer 2001; Bhunia 2018). Dokáže také indukovat uvolňování laktát dehydrogenázy z tkáně oční sítnice a způsobit tak nekrózu typickou pro endoftalmitidu (Beecher et al. 2000).

## Hemolyzin II

Hemolyzin II (HlyII) je hemolytický toxin o velikosti 42,6 kDa (Bhunia 2018). Aktivita hemolyzinu II (HlyII) není inhibována cholesterolem ani asntistreptolyzinovými protilátkami O (Sinev et al. 1993, Bhunia 2018). Je tepelně labilní a náchylný k proteolytickým enzymům (Baida et al. 1999). Jedná se o oligomerní toxin pro tvorbu  $\beta$ -barelů. HlyII vykazuje 28–31% identitu aminokyselinové sekvence se stafylokokovým  $\alpha$ -toxinem, ale má navíc 94aminokyselinové prodloužení C-terminálního konce, které chybí u ostatních známých toxinů tvořících  $\beta$ -barely. Tyto toxiny, se vážou na buněčné membrány a vytvářejí heptamerické oligomery. Každý monomer vloží do membrány segment bohatý na glycin, aby se vytvořil transmembránový pór. HlyII mimo to tvoří také v rovinných lipidových dvojvrstvách anion-selektivní kanálky (Andreeva-Kovalevskaya et al. 2008). HlyII indukuje lýzu erytrocytů a fagocytárních buněk (lidské monocyty a dendritické buňky), ale nepoškozuje epitelové buňky. Způsobuje také apoptózu hostitelských monocytů a makrofágů (Tran et al. 2011). Díky schopnosti zabíjet makrofágy si *B. cereus* prodlužuje pobyt v hostiteli. Může způsobit poškození tkáně a narušit antimikrobiální imunitní odpověď, čímž podporuje bakteriální šíření (Sineva et al. 2009). Virulence HlyII byla prokázána také u hmyzu (Miles et al. 2006).

Přesto, že je HlyII hemolytický a cytotoxický (Andreeva et al. 2006), mezi činitele způsobující průjmová onemocnění ale zahrnut není. Je možné, že je v tenkém střevě inaktivován trypsinem (Stenfors Arnesen et al. 2008).

## Hemolyzin III

Hemolyzin III (HlyIII) je nejméně probádaný hemolytický toxin ze skupiny *B. cereus*. Jedná se o tepelně labilní protein, jehož hemolytická aktivita není inhibována cholesterolem. Předpokládáný prekurzor má molekulovou hmotnost 24,4 kDa. Jeho aminokyselinová sekvence neobsahuje žádný jasný signální peptid pro sekreci (Baida & Kuzmin 1995). Předpokládá se, že obsahuje několik zbytkových transmembránových segmentů typických pro integrovaný membránový protein. Větší část (55 %) proteinu se skládá z přilehlých nepolárních zbytků, a proto je nejspíše nerozpustný ve vodě (Hofmann & Stoffel 1993).

Vlastnosti virulence nebyly zatím dostatečně probádány. Je pravděpodobné, že HlyIII tvoří transmembránové póry s odhadovaným průměrem 3 – 3,5 nm, které vedou k lýze erytrocytů. Vazba a tvorba pórů je nejspíše závislá na teplotě (Baida & Kuzmin 1996, Visiello et al. 2016).

#### Hemolyzin IV

Hemolyzin IV neboli cytotoxin K (CytK) je cytotoxický, nekrotický a hemolytický protein s molekulovou hmotností 34 kDa, který byl poprvé částečně charakterizován v roce 2000 Beecherem a Wongem (Beecher & Wong 2000). CytK byl poprvé izolován, klonován a skenován z kmene NVH 391/98. Tento kmen byl zodpovědný za průjemové onemocnění vyvolané potravinami, které u několika starších lidí vyvolalo krvavý průjem a ve třech případech dokonce zapříčinilo smrt (Lund et al. 2000). Od té doby bylo izolováno několik dalších podobných kmenů odpovědných za otravu z jídla. Kmen NVH 391/98 je nyní typovým kmenem nově validovaného druhu skupiny *B. cereus*, *Bacillus cytotoxicus* (Guinebretière et al. 2013).

O základním mechanismu působení CytK na buněčné úrovni je málo známo. Studie *in vitro* odhalily, že tento toxin tvoří póry, které jsou slabě aniontově selektivní ve fosfolipidových planárních dvojvrstvách. Způsob působení tohoto toxinu může zahrnovat tvorbu pórů, což má za následek uvolňování tekutin a ničení epitelových buněk končící nekrózou (Hardy et al. 2001). CytK se u *B. cereus* vyskytuje přibližně z 90 % (Bhunias 2018)

#### 3.2.2.3 Fosfolipázy

Fosfolipázy jsou většinou primárně považovány za toxiny, protože mají potenciál měnit fosfolipidy – primární strukturní jednotky biologických membrán (Griffith & Ryan 1999; Titball et al. 1999). *B. cereus* produkuje sfingomyelinázu a dvě fosfolipázy, známé jako lecitinázy C: fosfatidylcholin preferující (PC-PLC) a fosfatidylinositol specifická (PI-PLC). Oba enzymy mohou být významné při infekcích dýchacích cest, které mohou vést k nekróze a krvácení do tkání (Bhunias 2018).

#### Fosfolipáza c – fosfatidylinositol specifická (Lecitináza C, PI-PLC)

Fosfatidylinositol specifická fosfolipáza C (PI-PLC) *B. cereus* je členem široké rodiny enzymů vylučovaných bakteriemi a eukaryoty, včetně savců. Skládá se z 299 aminokyselin a velikost se udává 34,6 kDa (Heinz et al. 1996).

Bylo přezkoumáno mnoho možných mechanismů virulence fosfolipáz, včetně necytologické modulace hostitelských systémů (Titball et al. 1999). Předpokládá se, že tyto enzymy u *B. cereus* přispívají k virulenci podporou bakteriálního růstu v hostiteli. Přispívají také k plicní degradaci a k hemoragickým a nekrotickým abscesům mozku, často doprovázející meningitidu (Tokieda et al. 1999).

### Fosfolipáza – fosfatidylcholin preferující (cereolyzin A, PC-PLC)

Fosfatidylcholin preferující fosfolipáza (PC-PLC), taktéž nazývána cereolyzin A, patří do velké skupiny fosfolipáz, z nichž všechny obsahují ve svých aktivních místech atomy zinku a všechny jsou vylučovány gram pozitivními bakteriemi (Titball et al. 1999). Je tvořena kompaktní doménou  $\alpha$ -helixu s 259 aminokyselinami a její předpokládaná velikost je 29,9 kDa. *B. cereus* PC-PLC má širokou specifitu a primárně hydrolyzuje fosfatidylcholin. V menší míře hydrolyzuje fosfatidylethanolamin a fosfatidylserin. Vůči sfingomyelinu je téměř neaktivní. K její inaktivaci dochází odstraněním atomu zinku (Beecher & MacMillan 1990). Atomy zinku mají strukturální i funkční role, zajišťují tepelnou stabilitu a odolnost vůči proteázám a podílejí se na katalytických reakcích (Martin & Hergenrother 1999). PC-PLC může způsobovat narušení tkání a kůže (Firth et al. 1997).

### Sfingomyelináza (cereolysin B, SPH)

Sfingomyelináza (SPH), taktéž nazývána cereolyzin B, je 34,2 kDa velký enzym, který má na svém aktivním místě nejméně 2 atomy hořčíku. SMase specificky hydrolyzuje sfingomyelin na ceramid a fosforylcholin (ChoP) umístěný v eukaryotických membránách (Fujii et al. 1998; Bhunia 2018).

*B. cereus* může způsobit hemolýzu i kombinovaným/synergickým účinkem fosfatidylcholin specifické fosfolipázy C (PC-PLC) a sfingomyelinázy (SPH), které společně tvoří biologický komplex známý jako cereolyzin AB (CerAB) (Gilmore et al. 1989). Tento komplex narušuje buněčné membrány. Specificky hydrolyzuje sfingomyelin v intaktních membránách erytrocytů, což způsobuje následnou hemolýzu. K hemolýze dochází enzymatickou degradací buněčné membrány, nikoli tvorbou pórů (Ramarao & Sanchis 2013).

#### 3.2.2.4 Enterotoxin T (BceT)

Jedná se o 41 kDa velký enterotoxin, kódovaný genem *bceT*, který je uvolňován během lýzy buňky. Jeho biologická aktivita nebyla prozatím prokázána a je stále diskutována. Není pravděpodobné, že by byl jednou z příčin alimentárních otrav (Visiello et al. 2016).

#### 3.2.2.5 Enterotoxin FM (EntFM)

Enterotoxin FM (EntFM) je o polypeptid (45kDa) bohatý na beta strukturu a můžeme u něj pozorovat některá neobvyklá sekvenční uspořádání, jako například opakování aminokyseliny asparaginu kolem zbytku 280 (Bhunia 2018). EntFM je součástí buněčných stěn, zdá se být důležitý pro udržení tvaru buněčné stěny, motilitu, adhezní potenciál k epitelovým buňkám, tvorbu biofilmu a vakuolizaci makrofágů (Visiello et al. 2016).

Jedná se o nejrozšířenější gen enterotoxinu, který je často přítomen v ohniskách otrav z jídla (Bhunia 2018). Podle Boonchai et al. (2008) je EntFM v případě *B. cereus* cytotoxický

a stupeň toxicity závisí na typu kmene. V laboratorním experimentu způsobil purifikovaný EntFM zvýšenou vaskulární permeabilitu a akumulaci tekutin ve střevech králíků/myši. Pro myši byl dokonce smrtelný (Bhunia 2018).

### 3.2.3 Další onemocnění

*B. cereus* je stále více uznáván také jako oportunní patogen, který může způsobovat místní i systémové infekce. Novorozenci a jiní oslabení jedinci jsou zvláště ohroženi infekcemi jako jsou infekce centrálního nervového systému, endokarditida, infekce dýchacích a močových cest, infekčními ranami a septicémií (Bottone 2010). U přežvýkavců může *B. cereus* způsobit vážné infekce mléčné žlázy (Mavangira et al. 2013).

#### 3.2.3.1 Immune inhibitor A

Imunne inhibitor A (InhA1) patří mezi proteázy a jeho homology jsou přítomné u *B. cereus*, *B. anthracis* a *B. thuringiensis* (Dubois et al. 2012). Poprvé byl popsán u kmene *B. thuringiensis* jako inhibitor imunitního systému díky jeho schopnosti působit proti humorální obranné soustavě hmyzu *Hyalophora cecropia*. InhA1 dokáže degradovat dvě třídy hmyzích antimikrobiálních peptidů a také několik složek hostitelské tkáně (Chung et al. 2006). Také bylo prokázáno, že InhA1 narušuje hematoencefalickou bariéru, způsobuje degradaci hemoglobinu a narušuje koagulační systémy (Mukherjee et al. 2011).

InhA1 je sekretován do extracelulárního media a je také součástí hlavní proteinové složky exosporia u spor, která může hrát roli v bakteriální rezistenci vůči hostiteli (Charlton et al. 1999). Přesná role tohoto proteinu a mechanismus rezistence je třeba ještě objasnit. Kromě toho, *B. thuringiensis* a *B. cereus* produkují alespoň dvě další metaloproteázy patřící do rodiny InhA, InhA2 a InhA3. Tyto metaloproteázy sdílejí více než 66 % identity a jsou považovány za důležité virulentní faktory, které mohou bakteriím umožnit ochranu proti hostitelskému imunitnímu systému (Guillemet et al. 2010).

#### 3.2.3.2 Toxiny *B. anthracis*

Virulence *B. anthracis* u zvířat i lidí závisí na dvou hlavních virulentních faktorech, které jsou kódované na dvou velkých plazmidech. Prvním plazmidem je pXO1, který kóduje geny pro komplex letálních toxinů, a druhým plazmidem je pXO2, který kóduje geny pro kapsulu složenou z poly- $\gamma$ -D-glutamové kyseliny (Keppie et al. 1963; Brézillon et al. 2015). Kapsule hraje zásadní roli při vzniku infekce, protože chrání bakterie před fagocytózou (Makino et al. 2002). Pro dosažení virulence jsou oba dva plazmidy nezbytné. Podle Welkos & Friedlander (1988) kmeny postrádající pXO2 plazmidy jsou  $10^5$ krát méně virulentní.

Historicky byly všechny kmeny nesoucí pXO1 nebo pXO2 označovány jako *B. anthracis*. Toto označení se dnes ale ukazuje být spekulativním (Brézillon et al. 2015). Byly identifikovány kmeny *B. cereus*, které produkují obdobné toxiny jako *B. anthracis* a které byly shledány jako etiologické agens kožních a respiračních infekcí podobajících se antraxu. (Hoffmaster et al. 2004).

### 3.3 Antimikrobiální aktivita

Patogenní mikroorganismy, jako jsou *B. cereus*, *Listeria monocytogenes* a *Staphylococcus spp.* způsobují v potravinářském a hospodářském průmyslu velké problémy. K eliminaci těchto patogenů se už několik desítek let používají antibiotika na bázi penicilinu. Opakované používání a zneužívání antibiotik způsobilo vznik organismů odolných vůči jejich působení (Thomson & Bonomo 2005). Proto je předmětem zájmu vývoj účinnějších antimikrobiálních sloučenin. Antimikrobiální peptidy (AMP) produkované potravinářsky významnými bakteriemi mohou představovat velkou příležitost pro průmyslové využití. V současné době se za bezpečné považují bakterie mléčného kvašení (BMK), které jsou využívány při výrobě fermentovaných potravin, jako jsou jogurty či sýry. Některé jejich kmeny produkují bakteriociny (ribozomálně syntetizované AMP), které působí jako přírodní konzervační látky a jsou legislativně povoleny. Nejvýznamnějším bakteriocinem je nisin s označením E234, který produkují bakterie *Lactococcus lactis*. Nicméně, antimikrobiální aktivita bakterií z rodu *Bacillus* vykazuje v mnoha případech vyšší účinnost a lepší vlastnosti než nisin. Studium bakteriocinů rodu *Bacillus* má tudíž vysoký potenciál, který může přinést účinnější a biologicky bezpečné antimikrobiální sloučeniny (Lee & Kim 2011).

Zástupci rodu *Bacillus* produkují širokou škálu antimikrobiálních látek, včetně peptidových a lipopeptidových antibiotik a bakteriocinů. Produkují také mnoho nemodifikovaných bakteriocinů, z nichž se některé podobají pediocinu (produkt BMK rodu *Pediococcus*), a jiné vykazují zcela nové peptidové sekvence (Abriouel et al. 2011).

#### Antimikrobiální peptidy

Antimikrobiální peptidy byly nalezeny ve většině živých organismů – prokaryota, rostliny a zvířata včetně obratlovců a bezobratlých (Tossi et al. 2000). Schopnost produkovat antimikrobiální peptidy je také široce rozšířena mezi grampozitivními bakteriemi. Tyto látky mají rozmanité chemické struktury a hrají zásadní roli v přirozené imunitě (Zaslhoff 2002). Jsou směřovány proti konkurenčním mikroorganismům, a tím vytvářejí selektivní výhodu pro své producenty, aby přežily v omezených výživových podmínkách (Shai 2002; Papagianni 2003; Lee & Kim 2011). Antimikrobiální peptidy dosahují vysoké úrovně antimikrobiální aktivity proti široké škále patogenních mikroorganismů. Tyto peptidy lze rozdělit do dvou skupin na základě toho, zda jsou syntetizovány ribozomálně (bakteriociny), nebo neribozomálně (polymyxiny a ituriny) (Lee & Kim 2011). Bakteriociny vykazují relativně úzký rozsah antimikrobiální aktivity, inhibují zejména úzce příbuzné bakterie (Nissen-Meyer & Nes 1997), zatímco neribozomálně syntetizované peptidy vykazují širší spektrum působení, a kromě bakterií inhibují také houby (Maget-Dana & Peypoux 1994).

Antimikrobiální peptidy jsou v poslední době hojně zkoumány, mohou mít velký potenciál ve využití v potravinářském, zemědělském a farmaceutickém průmyslu. Sloužit mohou ke kontrole nebo k prevenci vůči patogenním mikroorganismům (Lee & Kim 2011).



### 3.3.1 Bakteriociny

Bakteriální antimikrobiální peptidy syntetizované ribozomálně se běžně označují jako bakteriociny (Riley & Wertz 2002). Vykazují vysoký stupeň cílové specifity proti příbuzným bakteriím, ačkoli mnoho z nich má širší spektrum aktivity (Jack et al. 1995). Bakteriociny jsou obecně považovány za bezpečné, a proto byly také nejvíce zkoumány. Jelikož se jedná o proteiny, předpokládá se, že v gastrointestinálním traktu lidí degradují, a proto by mohly být použity jako přírodní konzervační látky v potravinách bez vlivu na mikrobiotu konzumenta (Cleveland et al. 2001; Parisot et al. 2008).

Bakteriociny jsou na základě svých genetických a biochemických vlastností rozděleny do tří tříd. Bakteriociny I. třídy jsou malé (3-10 kDa) kationtové, amfifilní, membránově aktivní peptidy. Obvykle sestávají z 19–50 aminokyselin a podstupují značným posttranslačním modifikacím (Willey & van der Donk 2007). Vznikají tak nestandardní aminokyseliny, např. lanthionin,  $\beta$ -methyllanthionin, dehydrobutyrin, dehydroalanin a labyrinthin (Parada et al. 2007). Dále se bakteriociny I. třídy dělí do tří podskupin na základě jejich biosyntetických enzymů (Knerr & van der Donk 2012). Třída Ia zahrnuje lantibiotika, Ib: labyrinthopeptiny a třída Ic: sanctibiotika (Cuozzo & Sesma 2001; Abriouel et al. 2011; de la Fuente-Salcido et al. 2013). Nejznámější je třída Ia, lantibiotika. Mnoho lantibiotik vykazuje širokospektrální antimikrobiální aktivitu proti klinickým gram-pozitivním patogenům, včetně kmenů rezistentních vůči léčivům, a jsou proti těmto bakteriím klinicky aplikovány (Dischinger et al. 2014; Sandiford 2014).

Bakteriociny II. třídy modifikované aminokyseliny neobsahují. Jsou to malé, tepelně stabilní peptidy, které mohou být rozděleny do čtyř podskupin: IIa – pediocin-like bakteriociny, IIb – nemodifikované dvoupeptidové bakteriociny, IIc – cirkulární bakteriociny a IId – nemodifikované lineární bakteriociny, non-pediocin-like (Belguesmia et al. 2011). V této skupině jsou nejvýznamnější pediocin-like bakteriociny ze třídy IIa. Bakteriociny III. třídy jsou tepelně labilní proteiny s vysokou molekulovou hmotností (> 30 kDa), které nejsou ještě dostatečně probádány (Lee & Kim 2011; Kumariya et al. 2019).

Většina bakteriocinů nalezených u rodu *Bacillus* se řadí do Ia podskupiny lantibiotik (Lee & Kim 2011). Lantibiotika patří mezi nejlépe charakterizované antimikrobiální peptidy. Mnoho dalších antimikrobiálních látek, které nebyly úplně charakterizovány, je označováno jako inhibiční látky podobné bakteriocinům (bacteriocin-like inhibitory substances BLIS). Tento termín se také používá, pokud nebyla prokázána peptidová povaha antimikrobiální sloučeniny (Abriouel et al. 2011). Mezi nejznámější bakteriociny z rodu *Bacillus* řadíme subtilin (Parisot et al. 2008) a subtilosin A (Nakano et al. 2000), které produkuje *B. subtilis*.

U skupiny *B. cereus* byly identifikovány a popsány bakteriociny hlavně u kmenů *B. cereus sensu stricto* a u *B. thuringiensis*. U těchto dvou druhů bylo vyhlášeno více než 20 bakteriocinů (Abriouel et al. 2011; de la Fuente-Salcido et al. 2013) mezi nejprobádanější patří: thuricin (Xin et al. 2015b), ticin (Xin et al. 2015a), thusin (Xin et al. 2016), cerecidin (Wang et al. 2014) a cerein (Oscáriz et al. 2006). Jsou aktivní proti blízké příbuzným bacilům, například proti samotnému *B. cereus* (Rea et al. 2010). U *B. pseudomycooides* byl identifikován bakteriocin pseudomycoicidin (Basi-Chipalu et al. 2015). Řada bakteriocinů ale také vykazuje antimikrobiální aktivitu proti různým patogenním mikroorganismům a původcům kažení

potravin (Ahern et al. 2003; Chehimi et al. 2007; Sebei et al. 2007; Lee et al. 2009). Ve skupině *B. cereus* byly dosud zaznamenány spíše nemodifikované bakteriociny (de la Fuente-Salcido et al. 2013).

#### 3.3.1.1 Thuricin

Thuricin CD, dvoupeptidový bakteriocin skládající se z Trn- $\alpha$  a Trn- $\beta$ , je antibakteriálně aktivní vůči *Clostridium difficile* a *Listeria monocytogenes* (Rea et al. 2010). Kmeny *B. thuringiensis* T01001 a BMB1661 produkují dva typy thuricinu: thuricin 4A-4 a jeho derivát thuricin 4A-4D, které jsou aktivní vůči grampozitivním bakteriím včetně *B. cereus sensu stricto*, *B. thuringiensis*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, *Enterococcus faecalis*, *Mircobacterium*, *Paenibacillus*, *Staphylococcus aureus* a *Staphylococcus sciuri*. Dokáže inhibovat i klíčení spor u rodu *Bacillus*. Antimikrobiální aktivita thuricinu 4A-4 je u všech zmiňovaných bakterií vyšší než u thuricinu 4A-4D (Xin et al. 2015b).

#### 3.3.1.2 Ticiny

Ticiny A1, A3 a A4 byly objeveny u *B. thuringiensis* BMB3201 jako zástupci bakteriocinů třídy Ib. Jsou unikátní pro svou velkou termostabilitu, 121 °C po dobu 30 min a toleranci pH v rozmezí od 2,0 do 9,0. Jejich antimikrobiální aktivita byla pozorována proti dvou patogenům vyskytujícím se nejčastěji v potravinách, *B. cereus* a *L. monocytogenes*. Aktivita ticinu byla u těchto dvou indikátorů vyšší než aktivita nisinu. U ticinu A4 se aktivita projevila také proti *B. amyloliquefaciens*, *B. firmus*, *B. thuringiensis*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, *Enterococcus faecalis*, *Microbacterium*, *Paenibacillus*, *Staphylococcus aureus*, and *Staphylococcus sciuri* (Xin et al. 2015a).

#### 3.3.1.3 Thusin

*B. thuringiensis* (kmen BGSC 4BT1) produkuje dvousložkové lantibiotikum zvané thusin. Dvě složky Ths $\alpha$  a Ths $\beta$  působí synergicky proti velkému množství grampozitivních bakterií včetně *B. cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus sciuri*, *Enterococcus faecalis* a *Streptococcus pneumoniae*. Dokáže také zabránit růstu spor u *B. cereus*. Nejvyšší aktivita byla dosažena při poměru obou složek Ths $\alpha$  a Ths $\beta$  1:1. Při srovnání aktivity thusinu, thuricinu 4A-4 a ticinu, proti výše zmíněným grampozitivním bakteriálním patogenům, se u thusinu prokázala vyšší aktivita proti všem testovaným indikátorům, a proto má velký potenciál stát se součástí léčiv. To poukazuje na fakt, že dvousložková lantibiotika jsou více efektivní než jednosložková. Výhodou thusinu je také vysoká stabilita, která byla pozorována při rozmezí hodnot pH 2,0 - 9,0 a při teplotě 100 °C po dobu 30 min (Xin et al. 2016).

#### 3.3.1.4 Cerecidin

V genomu některých kmenů *B. cereus sensu stricto* byly nalezeny geny pro bakteriocin cerecidin řadící se do bakteriocinů II. třídy. Po jeho umělé syntéze se jeho aktivita prokázala proti širokému spektru grampozitivních bakterií včetně *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* a *Streptomyces*. (Wang et al. 2014).

### 3.3.1.5 Cereiny

Cerein 7A a cerein 7B jsou peptidické bakteriociny produkované kmenem *B. cereus* Bc7 (CECT 5148) na konci exponenciálního růstu. Oba bakteriociny působí nezávisle na sobě, nemají synergický účinek. Mají široké spektrum antibakteriální aktivity proti grampozitivním bakteriím. Proti gramnegativním bakteriím jsou neaktivní. Jsou to tepelně stabilní proteiny, jejichž aktivita přežívá ošetření i při 100 °C po dobu 15 min. Jsou také stabilní v širokém rozpětí pH a pod vlivem organických rozpouštědel nepodléhají ireverzibilní denaturaci. Klasifikovány jsou do II. skupiny bakteriocinů (Oscáriz & Pisabarro 2000; Oscáriz et al. 2006).

Cerein 8A je produkován půdní bakterií *B. cereus* 8A. Působí baktericidně proti *Listeria monocytogenes* a *Bacillus cereus sensu stricto*, a bakteriostaticky proti *Escherichia coli* a *Salmonella enteritidis* (Bizani et al. 2005).

### 3.3.1.6 Pseudomycoicidin

Bakteriocin patřící do podskupiny lantibiotik, Pseudomycoicidin, byl objeven u kmene *B. pseudomycooides* DSM 12442. Pomocí heterologní exprese byl vložen také do *Escherichia coli*. Struktura peptidu nebyla zcela objasněna, ale je známo, že má alespoň jeden thioester. Díky tomu je tento peptid rezistentní vůči trypsinu a jiným proteázám a nedochází k jeho degradaci při průchodu trávicím traktem. Jeho antimikrobiální aktivita je zaměřena proti grampozitivním bakteriím (Basi-Chipalu et al. 2015).

## 3.3.2 Antibiotika

Antibiotika jsou nízkomolekulární látky, které nejsou syntetizovány ribozomálně ale pomocí multienzymových komplexů (Hancock & Chapple 1999). Rod *Bacillus* produkuje velké množství antibiotických látek, mezi nejznámější patří polymyxiny, produkované *Paenibacillus polymyxa* (dříve *Bacillus polymyxa*), ale řadíme mezi ně také skupiny: tenziny, ituriny a fengyciny (Jacques 2011). Mezi nejprobádanější antibiotika, které produkují bakterie skupiny *B. cereus* patří: kanosamin, zwittermicin A a kurstakiny.

### 3.3.2.1 Kurstakiny

V roce 2000 byla objevena nová skupina antibiotik, kurstakiny, které produkuje *B. thuringiensis* a další druhy skupiny *B. cereus*, kromě *B. anthracis* a *B. cytotoxicus*. Kurstakiny jsou lipoheptapeptidy působící proti plísním, konkrétně proti *Stachybotrys charatum* (Béchet et al. 2012).

### 3.3.2.2 Kanosamin

Kanosamin, může být označován také jako antibiotikum B, byl nalezen u kmene *B. cereus* UW85. Toto antibiotikum bylo identifikováno jako 3-amino-3deoxy-D-glukóza. Biologická aktivita kanosaminu byla pozorována zejména u rostlin, u kterých dokázal inhibovat růst patogenních bakterií a hub. Jako senzitivní se ukázaly oomycety *Phytophthora medicaginis*, *Aphanomyces euteiches*, *Pythium aphanidermatum*, *Pythium torulosum*, některé

askomycety, bazidiomycety a bakterie *Lactobacillus acidophilus*, *Staphylococcus aureus* a *Erwinia herbicola* (Milner et al. 1996).

### 3.3.2.3 Zwittermicin A

Zwittermicin A je aminopolyolové antibiotikum produkované kmeny *B. cereus* UW85 a *B. cereus* AH1134 a nejspíše i několika dalšími kmeny. Jeho chemickou strukturu tvoří aminokyselinové, ethanoaminové a glykolové skupiny. Biologická aktivita je různorodá, působí jak proti grampozitivním, tak proti gramnegativním bakteriím, dokáže potlačit onemocnění rostlin způsobené protisty, inhibuje růst plísní i bakterií a podporuje insekticidní účinky *B. thuringiensis* (Kevany et al. 2009).

### 3.3.3 Insekticidní aktivita

Ekologické mikrobiální insekticidy jsou vhodnou alternativou chemických pesticidů, které mají za cíl hromadnou kontrolu ničivých škůdců rostlin. Velkou roli na trhu s bioinsekticidy hraje *B. thuringiensis* (Lacey et al. 2015).

Princip spočívá v produkci parasporálních krystalických proteinů označovaných jako Cry proteiny nebo d-endotoxiny, které jsou kódovány plazmidem a využívají se pro mikrobiologickou kontrolu hmyzích larev (Lechner et al. 1998; Nakamura 1998). Cry proteiny jsou toxické pro širokou škálu hmyzích škůdců, jako jsou Lepidoptera, Coleoptera a Diptera (Salehi Jouzani et al. 2008). Avšak ne u všech bakterií *B. thuringiensis* mohou být tyto proteiny aktivní (Ehling-Schulz et al. 2019). Cry geny se často nacházejí v blízkosti některých genových sekvencí, např. IS231 a IS232, a může zde docházet k horizontálnímu genovému přenosu, což vede k velké rozmanitosti a mnohočetnosti genů (Mahillon et al. 1994). V roce 1977 byl objeven poddruh *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, který působí proti komárům (Goldberg & Margalit 1977).

Působnost biopesticidů na bázi *B. thuringiensis* je specifická, a proto jsou jeho nepříznivé účinky na necílové organizmy velmi omezené. Produkce i jeho aplikace jsou jednoduché a levné. Díky těmto vlastnostem se biopesticidy obsahující *B. thuringiensis* staly velice úspěšné (Lacey et al. 2015; Jain et al. 2016). Tvoří přibližně 75 % světového trhu s bioinsekticidy, což představuje asi 4 % globálních insekticidů (Sanchis 2011). Mimo to se cry geny začaly využívat v rostlinném genetickém inženýrství k tomu, aby plodiny byly vůči různým škůdcům samy odolné (Melo et al. 2016).

Testování komerčních insekticidů na bázi *B. thuringiensis* (Bactimos, DiPel, Florbac FC, Foray 48B, Novodor FC, Turex, VecTobac, XenTari) ukázalo, že v těchto kmenech jsou přítomny enterotoxiny. Fletcher & Logan (1999) a Tayabali & Seligy (2000) zjistili, že kmeny *B. thuringiensis* byly pozitivní na Nhe enterotoxin a vykazovaly cytotoxický účinek. Frederiksen et al. (2006) a Hendriksen & Hansen (2006) ve svých studiích naznačují, že kmeny způsobující otravu by mohly být zbytky biopesticidů aplikovaných v terénu, nebylo to však prokázáno.

Kromě Cry proteinů byly objeveny také insekticidní Cyt proteiny a vegetativní insekticidní proteiny (Vis, produkované během vegetativní fáze). Díky nim se může insekticidní aktivita rozšířit také na roztoče a hlístice (Abdelmalek et al. 2015).

### 3.3.4 Buněčná komunikace

#### 3.3.4.1 Quorum sensing

Pro vzájemnou komunikaci bakterie syntetizují, vylučují a akumulují malé difuzní signální molekuly, známé jako autoinduktory. Detekce těchto autoinduktorů závisí na jejich prahové koncentraci (quora). Koncentrace se zvyšuje s růstem populace bakterií. Protože je tento jev závislý na buněčné hustotě, byl označen jako quorum sensing (QS). Jakmile je dosaženo kritické koncentrace, je vyslána koordinovaná odpověď v celé bakteriální populaci. QS je tedy důležitý pro autonomii bakterií, protože jim umožňuje provádět kolektivní chování. To jim dává větší šanci na úspěšné působení v prostředí (Kareb & Aider 2019).

Tato komunikace umožňuje bakteriím regulovat mnoho fyziologických funkcí jako jsou virulence, bioluminiscence, horizontální přenos DNA, syntéza antibiotik a bakteriocinů, schopnost odolávat kyselému prostředí v žaludku, produkce sekundárních metabolitů a tvorba biofilmu (Di Cagno et al. 2011; Skandamis & Nychas 2012). Po dosažení kritické koncentrace se signální molekuly navazují na receptory uvnitř bakteriálních buněk, a tak dojde k jejich aktivaci. Tyto receptory následně mohou změnit expresi genu, aby aktivovaly chování, které je prospěšné za konkrétních vyskytujících se podmínek (Fuqua & Winans 1996; Bassler & Losick 2006; Antunes & Ferreira 2009).

U bakterií byly popsány tři nejvíce studované typy signálních molekul zapojené do tohoto jevu. První jsou Acyl-homoserinové laktony (AHL), molekuly používané gramnegativními bakteriemi. Další jsou autoindukční peptidy (AIP), malé oligopeptidy používané grampozitivními bakteriemi (Di Cagno et al. 2011). Obě tyto molekuly jsou zapojené především do vnitrodruhových komunikačních jevů. Ovlivňují například produkci antibiotik, tvorbu biofilmu, fixaci dusíku, konjugaci atd. (Kalia & Purohit 2008; Verma et al. 2010). Třetím autoinduktorem je Autoinducer-2 (AI-2), sloučenina na bázi cyklických furanonů, která je považována za univerzální druhový signál (Roy et al. 2011). *B. cereus sensu stricto* dokáže AI-2 rozpoznat i produkovat (Auger et al. 2006).

U grampozitivních bakterií závisí komunikace mezi buňkami především na cytoplazmatických senzorech regulovaných signálními AIP. Byly mezi ně zařazeny peptidy Rap, NrpR a PlcR souhrnně označované jako RNPP (Declereck et al. 2007). Regulátory NrpR a PlcR jsou transkripční faktory, které přímo regulují genovou expresi. PlcR hraje důležitou úlohu v metabolismu cysteinu a v odolnosti vůči oxidačnímu stresu. Regulátor NrpR řídí nekrotrofní vlastnosti, které umožňují bakteriím přežít v infikovaném hostiteli. Proteiny Rap negativně ovlivňují sporulaci (Slamti et al. 2014). PlcR je hlavním transkripčním regulátorem virulence u *B. thuringiensis*, a *B. cereus*. PapR je heptapeptid sekterovaný *B. cereus*, který aktivuje PlcR. Součástí tohoto systému jsou regulony, které obsahují několik extracelulárních virulentních faktorů včetně Hbl, Nhe, CytK a degradačních enzymů (fosfolipázy a proteázy) (Gohar et al. 2002; Huillet et al. 2016). PlcR u *B. cereus* a *B. thuringiensis* kontroluje přibližně 45 genů (Gohar et al. 2008).

Oportunní bakterie jsou schopny zakódovat komunikační signály QS a použít informace pro svůj vlastní prospěch. Tato interference je definována antagonistickým mechanismem zvaným quorum quenching (Brackman & Coenye 2015)

### 3.3.4.2 Quorum quenching

Quorum quenching (QQ) označuje všechny procesy podílející se na narušení QS (Dong et al. 2001). QQ způsobují molekuly různé povahy (enzymy, chemické sloučeniny) s různým způsobem působení (štěpení signálu QS, kompetitivní inhibice atd.). Enzymy, které inaktivují signály QS, se obvykle nazývají enzymy QQ, zatímco chemické látky narušující dráhy QS se nazývají inhibitory QS (QSI). Mezi nejznámější QSI patří AHL laktonáza, důkladně studovaná i u bakterií skupiny *B. cereus*. Narušení QS ovlivňují také fyzikální parametry jako jsou teplota a pH (Delalande et al. 2005). Mechanismus QQ může působit tak, že blokuje generování specifických molekul, narušuje tok výměny nebo způsobuje degradaci signálních molekul (Di Cagno et al. 2011). V této souvislosti jsou nejvýznamnější enzymy schopné degradovat AHL např. již zmiňovaná AHL laktonáza (Chen et al. 2013).

Rozsáhlé používání antibiotik a chemických léčiv ke kontrole patogenních bakterií vedlo ke vzniku mikroorganismů, které začaly být rezistentní vůči lékům, a k hromadění chemikálií v potravinovém řetězci (Chen et al. 2010). V době, kdy začíná být obtížné léčit bakteriální infekce konvenčními antibiotiky, je třeba začít hledat způsob, jak zmírnit patogenitu těchto bakterií. QQ je považován za přirozený mechanismus, který probíhá mezi mikroorganismy. Tento mechanismus má potenciál ve vývoji antibakteriálních a protinádorových strategií v medicíně, zemědělství a vodním inženýrství (Grandclément et al. 2016) a nabízí nové způsoby konzervace či ochrany potravin (Skandamis & Nychas 2012). QQ mohou zamezit patogenním mikroorganismům vytvářet biofilm, či exprimovat faktory virulence. Přibližně 65 % infekčních onemocnění je způsobeno bakteriemi, které rychle expandují vytvářením biofilmů. Bakterie v biofilmu jsou odolnější vůči antibiotikům (Koch & Høiby 2000). Velkou výhodou je minimální možnost vzniku rezistence vůči QQ strategii. Předpokládá se, že QQ strategie vyvíjí na patogena omezený selektivní tlak, a tím rozvoj rezistence minimalizuje (Rasko & Sperandio 2010).

### 3.3.4.3 AHL laktonáza

AHL laktonáza je enzym, který dokáže narušit N-Acyl-homoserinové laktony (AHL), otevřením laktonového kruhu (Cao & Meighen 1989). Tyto enzymy byly kromě rodu *Bacillus* nalezeny také u *Agrobacterium*, *Arthrobacter* či *Klebsiella* (Dong et al. 2007; Chan et al. 2010; Chu et al. 2010; Kalia et al. 2011). Z přibližně 100 dostupných sekvencí genu kódujících AHL-laktonázu, bylo 88 získáno ze zástupců rodu *Bacillus*, 10 z rodu *Acinetobacter* a po jednom z druhů *Acidobacteria*, *Agrobacterium*, *Streptomyces*, *Klebsiella* a *Pseudomonas* (Reimann et al. 2002; Park et al. 2005; Riaz et al. 2008; Kalia & Purohit 2011).

+Rod *Bacillus* je ideálním nosičem těchto inhibitorů. Inhibice AHL byla popsána u druhů *B. thuringiensis*, *B. cereus* a *B. mycoides*. U *B. anthracis* byl nalezen podobný gen, ve kterém je 81 % nukleotidů shodných s genem kódujícím AHL laktonázu. Je tedy možné, že *B. anthracis* má podobný enzym inhibující AHL (Dong et al. 2002).

V přírodě je QS primárně strategie přežití, kdy bakterie soutěží o omezené zdroje výživy a projevuje svůj obranný mechanismus proti konkurentům. Potenciál QSI narušit strukturu biofilmu a zvýšit tak citlivost na antibiotika otevřela novou formu pro účinnou kontrolu těchto

bakteriálních infekcí (Dong et al. 2000; Lin et al. 2003; Ueda & Wood 2009; Cai et al. 2011; Kalia & Purohit 2011). *Bacillus* má schopnost produkovat laktonázu proti široké škále QS systémů závislých na AHL (Huma et al. 2011).

### 3.4 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je běžná laboratorní technika využívaná k syntéze určitého fragmentu DNA. Tuto metodu vynalezl v roce 1983 americký chemik Kary Mullis a v roce 1993 za ni obdržel Nobelovu cenu. Díky objevu PCR se rapidně urychlilo studium genů a genomů (McPherson & Møller 2006). Typickým cílem PCR je vytvořit dostatek kopií cílové oblasti DNA, aby mohla být následně analyzována jiným způsobem (sekvenování, vizualizace gelovou elektroforézou, klonování). Replikace DNA vyžaduje enzym DNA polymerázu, která dokáže začlenit volné nukleotidy do řetězce a tím syntetizovat nová vlákna DNA. DNA polymeráza typicky používaná v PCR se nazývá Taq polymeráza, která má pro PCR jednu klíčovou vlastnost, extrémní odolnost vůči vysokým teplotám. Pojmenována byla podle termofilní bakterie, ze které byla izolována (*Thermus aquaticus*) (Reece et al. 2012).

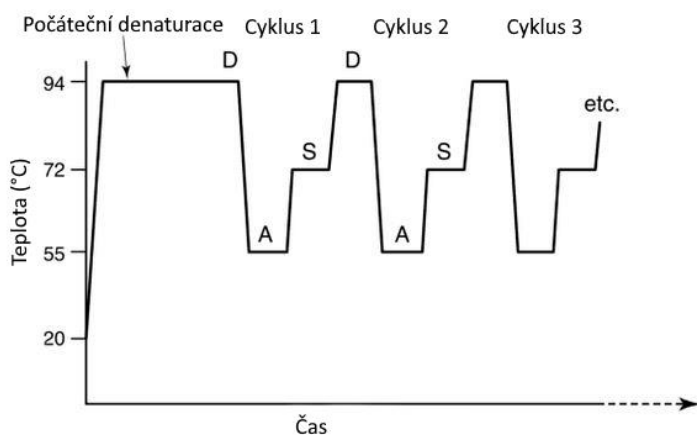
Pro reakci jsou dále nezbytné dva tzv. primery, které představují výchozí (Forward) a konečný (Reverse) bod pro syntézu DNA a lemují tak cílovou část DNA, která je kopírována. Primery jsou krátké úseky jednovláknové DNA (oligonukleotidy), obvykle dlouhé kolem 20 nukleotidů. Tato sekvence určuje místo, kde se primery navážou na základě komplementárního párování bází a ohraničí tak cílovou oblast (McPherson & Møller 2006).

Pro PCR reakci jsou nezbytné: primery, Taq polymeráza, templátová DNA, nukleotidy (stavební bloky DNA) pufr a ionty hořčíku. Složky jsou smíchány do zkumavky a podrobeny opakovaným cyklům zahřívání a ochlazování, které umožňují syntetizovat DNA.

#### Fáze PCR

1. Denaturace (denaturation): probíhá za vysoké teploty kolem 95 °C, dochází k oddělení (denaturaci) řetězce DNA. Výsledkem jsou jednovláknové šablony pro další krok.
2. Hybridizace (annealing): Dochází k ochlazení reakce na teplotu 55–65 °C. Primery se navážou na své komplementární sekvence.
3. Elongace (extenze): teplota je opět mírně zvýšena na 68–72 °C, Taq polymeráza prodlužuje vlákno primerů a syntetizuje tak nový řetězec DNA.

Tento cyklus se 25–35krát opakuje. Celkově pak PCR reakce může trvat 2-4 hodiny, v závislosti na délce kopírované oblasti DNA. Teplotní cyklus je znázorněn na Obrázku č. 3. Pokud je reakce účinná, může vzniknout i několik miliard kopií cílového segmentu. Při kopiích se nepoužívá pouze základní část DNA, ale nově vytvořené DNA během reakce slouží také jako šablona. Počet nově vytvořených vláken tak roste exponenciálně (Reece et al. 2014).



**Obrázek č. 3:** Znázornění teplotního cyklu během PCR. Proces je zahájen počáteční denaturací a následuje série opakujících se cyklů teplot od denaturace dvouvláknových molekul (D) následované nasedáním primerů na templát (A) až po syntézu nové DNA v oblasti ohraničené primery (S) (upraveno podle McPherson & Møller 2006).

PCR má široké uplatnění a jedním z častých využití je detekce genů, které kódují faktory virulence. PCR neodhaluje skutečný patogenní potenciál kmenů, protože exprese genů může být buď inhibována, nebo může být závislá na vnějších faktorech. Nicméně je užitečným nástrojem vypovídajícím o distribuci těchto genů. V potravinových matricích se někdy nacházejí inhibitory, které detekci na bázi PCR brání, proto je lepší bakteriální buňky před analýzou separovat (Bhunia 2018).



## 4 Metodika

Praktická část diplomové práce je zaměřena na biologickou aktivitu bakterií skupiny *B. cereus*. Testována byla hemolytická, lecitinázová a antimikrobiální aktivita. Pomocí PCR byla sledována přítomnost toxinových genů.

### Testované kmeny

Seznam testovaných kmenů bakterií skupiny *B. cereus* je uveden v Tabulce č: 1, včetně jejich označení a původu. Všechny kmeny byly izolovány z potravin nebo krmiv, jeden byl izolován ze vzduchu. Použity byly také sbírkové kmeny. Identifikovány byly pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF. Jedná se o předběžnou identifikaci, metoda nemá dostatečnou diskriminační schopnost k přesnému rozlišení jednotlivých druhů v rámci skupiny.

Pro testování antimikrobiální aktivity byly jako indikátory použity patogenní mikroorganismy, účastníci se také na kažení potravin a krmiv, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens* a *B. cereus*. Jedná se o sbírkové kmeny, které jsou také uvedeny v Tabulce č. 1.

**Tabulka č. 1: Seznam testovaných kmenů, jejich označení a původ.**

Označení kmene	Identifikace MALDI-TOF	Původ
1CP	<i>B. cereus</i>	psí granule
1CPO <sub>2</sub>	<i>B. cereus</i>	psí granule
2CP	<i>B. cereus</i>	psí granule
2CPO <sub>2</sub>	<i>B. cereus</i>	psí granule
3CP	<i>B. cereus</i>	psí granule
3CPO <sub>2</sub>	<i>B. cereus</i>	psí granule
4CP	<i>B. cereus</i>	psí granule
4CPO <sub>2</sub>	<i>B. cereus</i>	psí granule
5CP	<i>B. cereus</i>	psí granule
5CPO <sub>2</sub>	<i>B. cereus</i>	psí granule
6CP	<i>B. cereus</i>	psí granule
6CPO <sub>2</sub>	<i>B. cereus</i>	psí granule
9CP	<i>B. cereus</i>	losos sušený
9CPO <sub>2</sub>	<i>B. thuringiensis</i>	losos sušený
10CP	<i>B. cereus</i>	losos sušený
10CPO <sub>2</sub>	<i>B. cereus</i>	losos sušený
11CP	<i>B. cereus</i>	sušený kuřecí pařát
12CP	<i>B. cereus</i>	sušený kuřecí pařát
12CPO <sub>2</sub>	<i>B. cereus</i>	sušený kuřecí pařát
1/3 A1	<i>B. cereus</i>	trávicí trakt včely medonosné
1/3 A2	<i>B. cereus</i>	trávicí trakt včely medonosné
1/3 B1	<i>B. thuringiensis</i>	trávicí trakt včely medonosné
RM 1/1	<i>B. mycoides/ thuringiensis</i>	riccota
RM 1/2	<i>B. mycoides/ thuringiensis</i>	riccota
A72 b	<i>B. cereus</i>	vzduch
MEDP1/1	<i>B. cereus</i>	med pastovaný
2/2 D	<i>B. cereus</i>	kakaové boby
1vz. M1	<i>B. cereus</i>	kakaové boby
CCM 2010	<i>B. cereus</i>	sbírkový kmen
ATCC 7644	<i>Listeria monocytogenes</i>	sbírkový kmen
DSMZ 11778	<i>Clostridium perfringens</i>	sbírkový kmen

CCM – Česká sbírka mikroorganismů, ATCC – Americká sbírka typových kultur, DSMZ – Německá sbírka pro mikroorganismy a buněčné kultury

#### 4.1 Zkouška hemolytické a lecitinázové aktivity

Zkouška hemolytické a lecitinázové aktivity je kultivační agarová metoda, při které se aktivita projevuje tvorbou zóny. Pro testování byly použity čerstvě narostlé kultury, kultivované v trypton-sojovém bujonu (TSB) po dobu 24 h při teplotě 30 °C, jejichž čistota byla ověřena mikroskopicky (Nikon instrument 100).

Pro sledování lecitinázové aktivity bylo použito médium Egg Yolk Agar Base (Himedia). Médium bylo sterilováno v tlakovém hrnci po dobu 45 min a vytemperováno na 50 °C ve vodní lázni. Následně byla přidána žloutková emulze (100 ml/l). Médium bylo rozlito do sterilních Petriho misek a ponecháno zatuhnout. Na povrch zatuhlé agarové plotny byla sterilní

mikrobiologickou kličkou rozetřena čerstvě narostlá kultura. Následná kultivace probíhala anaerobně při teplotě 30 °C po dobu 24 h. Lecitinázová aktivita se projevila tvorbou zóny precipitace v okolí kolonií.

Pro sledování hemolytické aktivity bylo připraveno médium Columbia agar base (Oxoid). Po 45 min sterilizaci v tlakovém hrnci a temperaci na 50 °C ve vodní lázni bylo přidáno 5 % objemu defibrinované ovčí krve. Médium bylo rozlito do sterilních Petriho misek a ponecháno zatuhnout. Na povrch agarové plotny byla sterilní mikrobiologickou kličkou rozetřena čerstvě narostlá bakteriální kultura a kultivace probíhala se stejných podmínek jako je uvedeno výše. Hemolytická aktivita se projevila tvorbou zón.

## 4.2 Stanovení antimikrobiální aktivity

Stanovení antimikrobiální aktivity bylo uskutečněno pomocí jamkové agarové difusní metody.

Testované potenciálně produkční kmeny byly kultivovány v TSB po dobu 48 h při teplotě 30 °C v aerobních podmínkách a jejich čistota byla ověřena mikroskopicky (Nikon instrument 100). Po kultivaci byly buňky odstraněny centrifugací při 14500 ot/min po dobu 5 min. Pro testování antimikrobiální aktivity byl použit supernatant. Indikátorové kmeny byly kultivovány za podmínek uvedených v Tabulce č. 2.

Médium vhodné pro daný indikátorový kmen, bylo sterilizováno v tlakovém hrnci po dobu 45 min a následně vytemperováno ve vodní lázni na teplotu 50 °C. Do sterilní Petriho misky byl napipetován 1 ml čerstvě narostlé kultury indikátorového kmene a poté byl zalit 20ml příslušného agaru (viz Tabulka č. 2) pomocí sklopné pipety. Krouživými pohyby byl indikátorový kmen promíchán s agarem, aby došlo k jeho rovnoměrnému rozprostření, a směs byla ponechána zatuhnout. Poté byly do agaru pomocí sterilního korkovrtu vytvořeny jamky s pravidelnými rozestupy. Přebytný agar uvnitř jamek byl vyjmut sterilní jehlou. Do jamek bylo aplikováno 60 µl supernatantu testovaných kmenů. Každý kmen byl testován ve třech opakováních. Misky byly uloženy do anaerostatu společně s vyvíječem anaerobní atmosféry (AnaeroGen). Po dobu 4 hodin byly uchovávány v lednici, aby mohla proběhnout difuze supernatantu do média. Následovala kultivace při optimální teplotě po dobu 24 h. Po inkubaci bylo sledováno, zda byly vytvořeny inhibiční zóny. Hodnotil se průměr inhibičních zón v mm.

**Tabulka č. 2:** Přehled použitých živných půd a podmínek kultivace pro jednotlivé indikátorové kmeny při testování antimikrobiální aktivity kmenů *B. cereus*.

Indikátorový kmen	Živné médium	Podmínky kultivace
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	Berineart infusion agar	anaerobně 24 h 37°C
<i>Bacillus cereus</i> CCM2010 <i>Clostridium perfringens</i> DSMZ 11778	Wilkins-Chalgren agar obohacený o sojový pepton (5 g/l), cystein (0,5 g/l) a tween 80 (1ml/l)	anaerobně 24 h 37°C

### 4.3 Stanovení patogenního profilu a potenciálu QQ

Z výše uvedených bylo náhodně vybráno 19 kmenů a testováno pro přítomnost genů, kódujících faktory virulence a enzym inhibující QS.

#### Izolace DNA

Testované kmeny byly kultivovány v TSB po dobu 24 h při teplotě 30 °C v aerobních podmínkách. Po uplynutí doby kultivace byl 1 ml kultury převeden do sterilní mikrokumavky Eppendorf (objem 2 ml) a odstředěn v centrifuze při 14500 ot/min po dobu 2 min. Vzniklý supernatant byl odstraněn a pelet resuspendován ve 100 µl PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent (Applied Biosystems). Směs byla následně inkubována po dobu 10 min při 100 °C. Po zchlazení na pokojovou teplotu po dobu 2 min došlo k opětovnému odstředění v centrifuze (14500 ot/min po dobu 2 min). Do nové sterilní mikrokumavky Eppendorf (objem 2 ml) bylo převedeno 80 µl supernatantu. Takto připravené buněčné lyzáty byly uchovávány v mrazničce a použity pro PCR.

#### PCR

Metodou PCR byla studována přítomnost genů kódujících cereulid, hemolyzin BL, nehemolytický enterotoxin, cytotoxin K, cereolyzin O, hemolyzin II, hemolyzin III, immune inhibitor A, fosfolipázu PI-PLC, fosfolipázu PC-PLC a sfingomyelinázu. Dále byla sledována přítomnost genu pro AHL laktonázu. Přehled testovaných genů, použitých primerů včetně sekvencí, předpokládaná velikost PCR produktů a PCR programu jsou uvedeny v Tabulce č. 3.

**Tabulka č. 3:** Přehled testovaných toxinových genů *B. cereus*, včetně jejich názvu, sekvence a velikosti. Ke každému testovanému genu jsou uvedeny použité primery a PCR program.

Toxin	Gen	Název primeru	Sekvence (5' - 3')	Velikost produktu (bp)	PCR program
Cereulid	<i>ces</i>	CesF1	GGTGACACATTATCATATAAGGTG	1271	PCR 1a
		CesR2	GTAAGCGAACCTGTCTGTAACAACA		
Hemolyzin BL	<i>hbl</i>	HD2F	GTA AAT TAI GAT GAI CAA TTTC	1091	PCR 1
		HA4R	AGA ATA GGC ATT CAT AGA TT		
Nehemolytický enterotoxin	<i>nhe</i>	NA2F	AAG CIG CTC TTC GIA TTC	766	PCR 1
		NB1R	ITI GTT GAA ATA AGC TGT GG		
Cytotoxin K	<i>cytK</i>	CKF2	ACAGATATCGGICAAAATGC	421	PCR 1
		CKR5	CAAGTIACTTGACCIGTTGC		
Cereolyzin O	<i>clo</i>	CerOf	GTATCTACTTGGAAATSAAAAG	659	PCR 6a
		CerOr	TAATCTGTATTGTTATGAAC		
Hemolyzin II	<i>hly II</i>	BcHlyII-S	AGAAGGAGTGGCTGTCTGTA	535	PCR 3
		BcHlyII-A	TTCTTTCCAAGCAAAGCTAC		
Hemolyzin III	<i>hly III</i>	BCHEM 1	AATGACACGAATGACACAAT	444	PCR 3
		BCHEM 3	ACGATTATGAGCCATCCCAT		
Immune inhibitor A	<i>inhA2</i>	inhA2.1	CGCGGATCCCACCGATTTATCTG	3087	PCR 6b
		inhA2.2	CCGGAATTCCTTTCCCCACATAATTTG		
Fosfolipáza c - fosfatidylinositol-specifická (Lecitináza C, piple)	<i>phosC</i>	phosC1	CGCTATCAAATGGACCATGG	569	PCR 3a
		phosC2	GGACTATTCCATGCTGTACC		
Fosfolipáza - fosfatidylcholin-preferující (Cereolysin A, pcpl)	<i>cerA</i>	CERA 1	ACTGAGTTAGAGAACGGTAT	536	PCR 3a
		CERA 2	CGCTTACCTGTCATTGGTGT		
Sfingomyelináza (Cereolysin B, Sph)	<i>cerB</i>	CERB 1	TCGTAGTAGTGGAAAGCGAAT	457	PCR 3a
		CERB 2	AGTCGCTGTATGTCCAGTAT		
AHL laktonáza	<i>aiiA</i>	AIF	TAAATGTAAAGGTGGATACATAATGACAGT	750	PCR 6c
		AIR	AGCTCATGACTTTTTGCACTATATATA		

Celkový objem reakční směsi pro PCR činil 25 µl a skládal se z 2 µl DNA, 1 µl forward primeru (10 µM), 1 µl reverse primeru (10 µM), 12,5 µl DreamTaq green PCR master mixu (ThermoFisher) a 8,5 µl PCR vody (nuclease-free water, Thermo Fisher). PCR amplifikace proběhla v automatickém termocykleru T100 (Bio-Rad). Teplotní podmínky amplifikace pro jednotlivé programy jsou uvedeny v Tabulce č. 4.

**Tabulka č. 4:** Programy pro PCR reakci využité pro určení přítomnosti toxinových genů *B. cereus*. Každý program sestává ze tří základních fází opakujících se 30krát za sebou. Těmto fázím předchází počáteční denaturace a uzavírá je konečná elongace. Podmínky jednotlivých fází určuje teplota uvedená ve °C a doba trvání.

Program	Fáze	Teplota (°C)	Čas	Počet cyklů
PCR 1	Počáteční denaturace	95	15 min	1 x
	Denaturace	95	30 s	30 x
	Hybridizace	49	30 s	
	Elongace	72	1 min	
	Konečná elongace	72	2 min	1 x
PCR 1a	Počáteční denaturace	95	3 min	1 x
	Denaturace	95	30 s	30 x
	Hybridizace	49	30 s	
	Elongace	72	90 s	
	Konečná elongace	72	7 min	1 x
PCR 3	Počáteční denaturace	95	3 min	1 x
	Denaturace	94	15 s	30 x
	Hybridizace	55	45 s	
	Elongace	72	2 min	
	Konečná elongace	72	2 min	1 x
PCR 3a	Počáteční denaturace	95	3 min	1 x
	Denaturace	94	30 s	30 x
	Hybridizace	55	30 s	
	Elongace	72	45 s	
	Konečná elongace	72	2 min	1 x
PCR 6a	Počáteční denaturace	95	3 min	1 x
	Denaturace	94	30 s	30 x
	Hybridizace	52	30 s	
	Elongace	72	45 s	
	Konečná elongace	72	5 min	1 x
PCR 6b	Počáteční denaturace	95	3 min	1 x
	Denaturace	94	30 s	30 x
	Hybridizace	55	45 s	
	Elongace	72	1 min	
	Konečná elongace	72	5 min	1 x
PCR 6c	Počáteční denaturace	95	3 min	1 x
	Denaturace	94	30 s	30 x
	Hybridizace	50	30 s	
	Elongace	72	2 min	
	Konečná elongace	72	7 min	1 x

### **Separace a vizualizace**

Pro vizualizaci PCR produktů byla použita metoda elektroforézy. Pro separaci byl použit 1% gel, který se skládal z 1 g agarózy a 100 ml 0,75x TAE pufru (40 mM Tris, 20 mM acetic acid, 1 mM EDTA, Fermentas). Gel byl rozvařen v mikrovlnné troubě, chvíli ponechán při pokojové teplotě zchladnout a následně bylo přidáno 5  $\mu$ l barviva GelRed<sup>TM</sup> (Biotium). Celá směs byla nalita do formy s přidávanými hřebeny pro vznik jamek a nechala se 20-30 minut ztuhnout. Poté se forma vložila do elektroforetické vany obsahující 0,75x TAE pufr a byly vyjmuty hřebeny. Do jamek bylo napipetováno 5  $\mu$ l PCR produktu. Do první a poslední jamky v řadě byl nanesen standard (podle velikosti očekávaných fragmentů: GeneRuler Low Range DNA Ladder nebo GeneRuler DNA Ladder Mix), pro pozdější odečtení velikosti fragmentů. Separace probíhala při konstantním napětí 130 V po dobu 60 min. Po uplynutí doby byly fragmenty DNA vizualizovány pomocí UV transiluminátoru (Bio-Rad). Sledována byla přítomnost a velikost vzniklých bandů, která byla odvozena od standardu.

## 5 Výsledky

### 5.1 Zkouška hemolytické a lecitinázové aktivity

Hemolytická aktivita byla hodnocena na základě vzniku zón v okolí kolonií:  $\alpha$  – hemolytická aktivita, při které neodchází k úplnému rozkladu hemoglobinu, se projevuje zeleným zbarvením zóny;  $\beta$  – hemolytická aktivita, při které dochází k úplnému rozkladu hemoglobinu se projevuje transparentní zónou. U všech testovaných kmenů byla s různou intenzitou pozorována  $\beta$  – hemolytická aktivita. Intenzita se projevovala velikostí zóny. U třech kmenů 3CP, 9CPO<sub>2</sub> a MEDP1/1 byla pozorována nižší aktivita, naopak u kmene 1/3B1 byla pozorována aktivita velmi vysoká. Většina kmenů projevovala střední hemolytickou aktivitu. Výsledky pro jednotlivé kmeny jsou uvedeny v Tabulce č. 5.

Lecitinázová aktivita byla také pozorována u všech kmenů. Intenzita, projevující se velikostí zóny precipitace, byla u všech kmenů stejná. Výsledky pro jednotlivé kmeny jsou uvedeny v Tabulce č. 5.

### 5.2 Stanovení antimikrobiální aktivity

Inhibiční aktivita kmenů *B. cereus* byla testována proti grampozitivním bakteriím *B. cereus* CCM 2010, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 a *Clostridium perfringens* DSMZ 11778. Aktivita se projevila tvorbou inhibiční zóny. Intenzita se posuzovala změřením průměru zóny v milimetrech. Výsledky testování antimikrobiální aktivity jsou uvedeny v Tabulce č. 5. Aktivitu vykazaly celkem tři kmeny. Všechny byly aktivní proti *B. cereus* CCM 2010. Největší inhibiční zóny byly pozorovány u kmene MEDP1/1, izolovaného z pastovaného medu (na Obrázku č. 4) a u kmene 6CPO<sub>2</sub>, izolovaného ze psích granulí (Obrázek č. 5). Kmen, 6CPO<sub>2</sub> byl také jediným aktivním kmenem proti *Clostridium perfringens* DSMZ 11778, ale jeho aktivita byla nižší, než u indikátorového kmene *B. cereus*. Výrazně menší inhibiční zóny jsou vidět na Obrázku č. 6. *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 nebyla inhibována žádným z testovaných kmenů.



**Obrázky č. 4, 5, 6:** Antimikrobiální aktivita proti *B. cereus* CCM 2010 u vzorků MEDP 1/1 (nalevo) a 6CPO<sub>2</sub> (uprostřed), projevující se výraznou inhibiční zónou. Antimikrobiální aktivita kmene 6CPO<sub>2</sub> proti *Clostridium perfringens* DSMZ 11778 (vpravo), projevující se slabou inhibiční zónou.



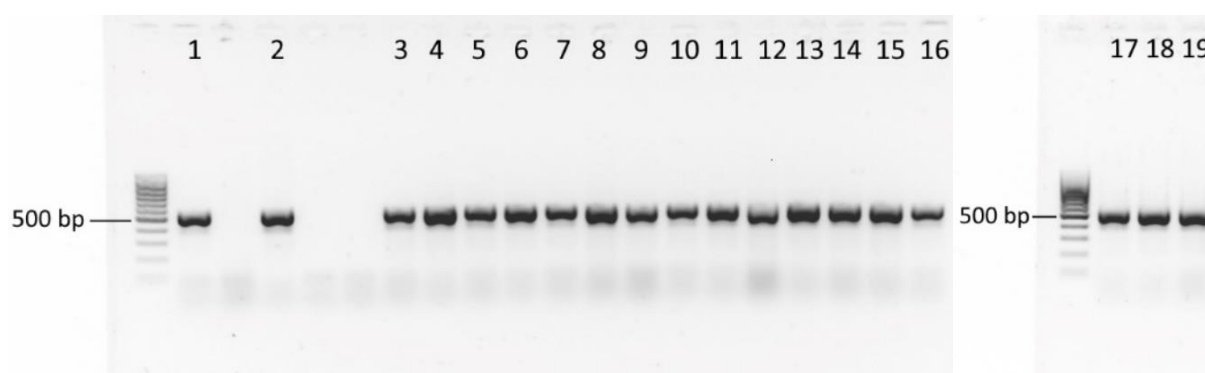
**Tabulka č. 5.** Biologická aktivita bakterií skupiny *B. cereus*. Hodnoty antimikrobiální aktivity jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr inhibičních zón v mm ± směrodatná odchylka (provedeno ve třech opakováních, hodnoty zahrnují velikost jamky 5 mm).

Kmen	Hemolytická aktivita	Lecitinázová aktivita	Antimikrobiální aktivita		
			<i>B. cereus</i> CCM 2010	<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	<i>Cl. perfringens</i> DSMZ 11778
1CP	++	++	R	R	R
1CPO <sub>2</sub>	++	++	R	R	R
2CP	++	++	R	R	R
2CPO <sub>2</sub>	++	++	R	R	R
3CP	+	++	R	R	R
3CPO <sub>2</sub>	++	++	R	R	R
4CP	++	++	R	R	R
4CPO <sub>2</sub>	++	++	R	R	R
5CP	++	++	R	R	R
5CPO <sub>2</sub>	++	++	R	R	R
6CP	++	++	R	R	R
6CPO <sub>2</sub>	++	++	13,00 ± 1,00	R	8,83 ± 0,29
9CP	++	++	R	R	R
9CPO <sub>2</sub>	+	++	R	R	R
10CP	++	++	R	R	R
10CPO <sub>2</sub>	++	++	R	R	R
11CP	++	++	R	R	R
12CP	++	++	R	R	R
12CPO <sub>2</sub>	++	++	R	R	R
1/3 A1	++	++	R	R	R
1/3 A2	++	++	R	R	R
1/3 B1	+++	++	R	R	R
RM 1/1	++	++	NT	NT	NT
RM 1/2	++	++	NT	NT	NT
A72 b	++	++	NT	NT	NT
MEDP1/1	+	++	13,33 ± 0,58	R	R
2/2D	++	++	9,67 ± 0,58	R	R
1vz. M1	++	++	R	R	R
CCM 2010	++	++	NT	NT	NT

R: rezistentní, NT: netestováno, +: mírná aktivita, ++: střední aktivita, +++: silná aktivita

### 5.3 Stanovení patogenního profilu a potenciálu QQ

Výsledky stanovení patogenního profilu a potenciálu pro inhibici QS jsou uvedeny v Tabulce č. 6. Patogenní profil byl u většiny kmenů podobný. Nejvíce se odlišovaly kmeny MEDP 1/1 identifikovaný jako *B. cereus* a sbírkový kmen *B. cereus* CCM 2010. Oba tyto kmeny, narozdíl od ostatních, nesly gen pro cytotoxin K. U *B. cereus* CCM 2010 byl navíc identifikován také gen pro hemolyzin II. Nehemolytický enterotoxin, cereolyzin O, hemolyzin III, fosfolipáza c fosfatidylinositol-specifická, fosfolipáza fosfatidylcholin-preferující (vizualizace je znázorněna na Obrázku č. 7) a sfingomyelináza byly detekovány u všech kmenů. Naopak cereulid, hemolyzin BL a immune inhibitor A2 byly u všech kmenů negativní. Enzym pro inhibici QQ, AHL-laktonáza, byl detekován pouze u *B. cereus* CCM 2010 a kmene MEDP 1/1.



**Obrázek č. 7:** Vizualizace amplifikace fosfatidylcholin preferující fosfolipázy o velikosti fragmentů 536 bp.

**Tabulka č. 6:** Přehled výsledků testování přítomnosti toxinových genů a genů pro QQ

Číslo vzorku	Kmen	ces	hbl	nhe	cytK	clo	hly II	hly III	inhA2	phosC	cerA	cerB	aiiA
1	<b>CCM 2010</b>	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
2	<b>MEDP 1/1</b>	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+
3	<b>1 CP</b>	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-
4	<b>3 CP</b>	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-
5	<b>5 CPO<sub>2</sub></b>	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-
6	<b>10 CPO<sub>2</sub></b>	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-
7	<b>12 CP</b>	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-
8	<b>1 CPO<sub>2</sub></b>	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-
9	<b>2CP</b>	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-
10	<b>2 CPO<sub>2</sub></b>	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-
11	<b>3 CPO<sub>2</sub></b>	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-
12	<b>4 CP</b>	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-
13	<b>4 CPO<sub>2</sub></b>	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-
14	<b>5 CPO<sub>2</sub></b>	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-
15	<b>6 CPO<sub>2</sub></b>	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-
16	<b>9 CP</b>	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-
17	<b>9 CPO<sub>2</sub></b>	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-
18	<b>10 CP</b>	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-
19	<b>12 CPO<sub>2</sub></b>	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-

## 6 Diskuze

*Bacillus cereus sensu lato* má široké spektrum virulentních faktorů, zároveň se ale může projevovat antimikrobiálně, antibioticky a může narušovat QS jiných bakterií. Je významným původcem kažení potravin. Znehodnocuje mléko a mléčné výrobky tzv. sladkým srážením mléka a hořknutím smetany. Kromě mléčných výrobků často kontaminuje maso, ryby a mořské plody, omáčky, rostlinné produkty a potraviny obsahující škrob, jako jsou mouky, rýže, brambory a těstoviny. Kažení a patogenní působení umožňují enzymy (lecitináza, sfingomyelináza, fosfolipáza) a toxiny (cereulid, hemolytické toxiny). K rozsáhlému patogennímu působení přispívá velké teplotní rozpětí, ve kterém je *B. cereus* schopen působit. Zahrnuje psychrofilní druhy, které dokážou růst při chladírenských teplotách a díky produkci spor přežívá i vysoká teplotní opatření kterých dosahuje pasterace.

K jedné z hlavních vlastností bakterií skupiny *B. cereus* je produkce hemolýzy. Podle Ceuppens et al. (2011) je hemolyticky aktivní většina kmenů *B. cereus*. *B. anthracis* byl považován za nehemolytický, ale některé kmeny *B. anthracis* mají hemolytické geny, které ale většinou nejsou exprimovány. Exprese genu je závislá na vnějších podmínkách, zvláště na velice striktním anaerobním prostředí (Klichko et al. 2003). Hwang & Park (2015) se zaměřili na rozšíření cytotoxicity mezi druhy. Za vysoce cytotoxické označili *B. cereus*, *B. thuringiensis* a *B. cytotoxicus*. *B. anthracis* a *B. mycooides* označili za níže cytotoxické a u *B. pseudomycooides* nebyla cytotoxicita pozorována vůbec. V našem pokusu jsme hemolýze podrobili 28 divokých kmenů a sbírkový kmen *B. cereus* CCM 2010. Velká část kmenů byla identifikována jako *B. cereus*, dva jako *B. thuringiensis* a dva nejistě jako *B. thuringiensis/B. mycooides*. Mohli jsme tedy očekávat, že se všechny, s výjimkou dvou nejistě určených, budou projevovat silně cytotoxicky. Všechny se na agaru s ovčí krví projevovaly  $\beta$  – hemolýzou, velikost zóny byla u tří kmenů malá. Jednalo se o kmeny: *B. cereus* (izolovaný ze psích granulí), *B. thuringiensis* (izolovaný ze sušeného lososa) a *B. cereus* (izolovaný z pastovaného medu). Výrazně větší hemolýza byla u kmene *B. thuringiensis* izolovaného z trávicího traktu včely medonosné. Můžeme se pouze dohadovat, zda používání biopesticidů na bázi *B. thuringiensis* mohlo zapříčinit jeho přítomnost v tráv. traktu včely medonosné. Posouzení hemolýzy se využívá také v laboratorních metodách při stanovení *B. cereus* v potravinách a krmivech. Podle normy ČSN EN ISO 7932 (2005) je po izolaci na selektivním agaru potřeba podrobit *B. cereus* confirmaci, která může probíhat právě na krevním agaru. Za hemolýzu ovčích erytrocytů je odpovědná sfingomyelináza, hemolytický enterotoxin a hemolýziny. V testovaných kmenech byla sfingomyelináza a hemolytické toxiny sledovány také pomocí PCR. Přítomnost sfingomyelinázy, hemolýzinu I a hemolýzinu III byla potvrzena u všech testovaných kmenů.

Lecitinázová aktivita byla také pozorována u všech 28 divokých kmenů a u sbírkového kmene *B. cereus* CCM 2010. Všechny vykazovaly bez rozdílu střední aktivitu, tedy zóna precipitace měla u všech srovnatelnou velikost. Za charakteristickou zónu precipitace kolem kolonií *B. cereus* jsou zodpovědné fosfolipázy, které způsobují degradaci lecitinu (neboli fosfatidilcholinu) vaječného žloutku. Tato vlastnost je využívána při izolaci a identifikaci *B. cereus*. Vaječný žloutek je součástí selektivního agaru MYP i PEMBA. Při PCR analýze byla přítomnost PC-PLC i PI-PLC potvrzena u všech kmenů. Ceuppens et al. (2011) a Hwang & Park (2015) zmiňují, že lecitináza může mít synergický účinek se sfingomyelinázou při narušování lidských červených krvinek. Pro lýzu lidských erytrocytů je potřeba SPH i PC-PLC,

protože lidské erytrocyty, na rozdíl od ovčích, obsahují v buněčné membráně desetinásobně vyšší koncentraci fosfatidylcholinu. Všechny 19 pozitivních kmenů by tedy bylo teoreticky schopné působit proti lidským erytrocytům.

Pomocí PCR jsme sledovali přítomnost i ostatních toxinových genů. *Bacillus cereus sensu lato* je velice známý pro svou produkci cereulidu. Cereulid byl pozorován u druhů *B. cereus*, *B. weihenstephanensis* a *B. thuringiensis* (Ceuppens et al. 2011). Žádný z 19 námi testovaných kmenů ale gen pro cereulid neměl. Prevalence cereulidu je totiž velice nízká, přibližně 1,5 %. Pokud nejsou potraviny vybírány zcela náhodně, ale jsou vybírány potraviny typické pro výskyt *B. cereus*, může být tato prevalence výrazně vyšší, až 32,8 % (Hoton et al. 2009). Vyšší výskyt byl sledován např. ve zmrzlínách 4,7 % (Messelhäuser et al. 2010) a v hotových jídlech 11 % (Wijnands et al. 2006). Mírně nadprůměrný výskyt byl u ryb a mořských plodů 1,6 % (Rahmati & Labbe 2008), v půdě 1,7 % (Altayar & Sutherland 2006) a v kravském mléce 1,5 % (Svensson et al. 2006). Emetické kmeny často vykazují specifické vlastnosti ve srovnání s jinými kmeny *B. cereus*, např. žádnou nebo slabou hemolýzu, neschopnost hydrolyzovat škrob a salicin a zvýšenou tepelnou odolnost jejich spor (Shinagawa 1993; Andersson et al. 2004; Carlin et al. 2006). Asi 7,5 % emetických kmenů je schopno hydrolyzy škrobu, fermentace salicinu a produkce enterotoxinu Hbl (Kim et al. 2010). Cereulid vykazuje nízký stupeň polymorfizmu (Guinebretière et al. 2002)

Na rozdíl od cereulidu vykazují geny enterotoxinů vyšší stupeň polymorfizmu a vyšší prevalenci mezi kmeny *B. cereus sensu stricto* (Guinebretière et al. 2002). Nhe a Hbl jsou rozšířeny mezi všechny druhy *B. cereus sensu lato*. CytK1 je omezen na druh *B. cytotoxicus*, CytK2 je široce rozšířen mezi všemi členy skupiny *B. cereus* (Rouzeau-Szynalski et al. 2020). Nejběžnějšími enterotoxinovými geny jsou Nhe a EntFM, které jsou přítomny 84–100 % případů. Moravek et al. (2006) a Bhunia (2018) uvádějí, že geny kódující Nhe jsou přítomny v téměř 100 % kmenů *B. cereus sensu lato*. Gen CytK je přítomen ve 37–89 % případů, Hbl gen ve 29–92 % případech, BceT ve 12–71 % a HlyII v 19–56 % (Guinebretière et al. 2002; Yang et al. 2005; Wijnands et al. 2006; Shadrin et al. 2007; Aragon-Alegro et al. 2008; Ngamwongsatit et al. 2008; Ouoba et al. 2008; Rahmati & Labbe 2008; Bonerba et al. 2010; Cadot et al. 2010). Tato prevalence není platná pouze pro kmeny *B. cereus sensu stricto*, podobné prevalence byly pozorovány i u kmenů *B. thuringiensis* (Swiecicka et al. 2006). Údaje o výskytu průjmového syndromu mají velký rozptyl hodnot a mohou být zkreslené, protože lidé ve většině případech nevyhledávají lékařskou pomoc. Navíc je často nesprávně diagnostikován a zaměněn za intoxikaci *Staphylococcus aureus*, protože se oba patogeny nacházejí v podobném potravinovém prostředí a vedou k nerozeznatelným symptomům (Rouzeau-Szynalski et al. 2020). Vzhledem k tomu, že jsou rozpětí jednotlivých prevalencí pro hemolytické kmeny široká, kmeny testované v této práci nepřinesly neočekávané výsledky. Žádný z 19 kmenů nenesl geny pro Hbl, naopak 100 % testovaných kmenů bylo pozitivních na Nhe, Hly III a Clo. Cytotoxin K byl potvrzen ve dvou případech. Hemolysin II byl potvrzen pouze u sbírkového kmene.

Jeßberger et al. (2014) také zmiňuje, že cytotoxicita *B. cereus* silně koreluje s koncentracemi Nhe B a Hbl L1 v supernatantu. Naopak Hwang & Park (2015) tvrdí, že míry cytotoxicity se dopředu nedá odhadnout, protože není spojena s určitým typem potravy a velký vliv má také stav imunitního systému člověka a variabilita genů.

Immune inhibitor A byl u všech testovaných kmenů negativní. Tato proteáza je spojována hlavně s *B. anthracis* a s výzkumem jeho mechanismu působení proti imunitnímu systému hostitele (Arolas et al. 2016). Výskyt byl potvrzen také u *B. cereus sensu stricto* a *B. thuringiensis*. AHL-laktonáza byla potvrzena u dvou testovaných kmenů včetně sbírkového kmene CCM 2010. Přítomnost AHL – laktonázy v nepatogenních kmenech (jako mohou být u *B. mycoides*) je příznivá pro její využití při kontrole bakteriálních infekcí člověka. Pro *B. cereus* CCM 2010 byl osekvenován celý genom. Naše výsledky PCR patogenního profilu a potenciálu QQ odpovídají údajům z celogenomového sekvenování.

Metoda PCR se může potýkat s několika problémy. Jedním z nich může být polymorfismus cílových genů. U bakterií skupiny *B. cereus* byla pozorována výměna genů mezi plazmidy a mezi plazmidy a chromozomy. Horizontální přenos může rozšířit virulenci mezi kmeny *B. cereus*. Příkladem je výměna genu *cry* mezi členy *B. cereus* v mrtvých larvách hmyzu prostřednictvím konjugačního přenosu plazmidů (Yuan et al. 2007). Potravinové matrice byly také shledány vhodným prostředím pro přenos plazmidů (Modrie et al. 2010). Prostředí může mít tedy velký vliv na virulenci, úroveň exprese toxinu a hostitelskou specifitu (Ceuppens et al. 2011). Ve studii Guinebretière et al. (2002) selhala detekce PCR ve 44 % u Nhe a v 19 % u Hbl. Od té doby ale došlo k výrazné optimalizaci primerů a detekce začala být výrazně spolehlivější. V našem případě nebyly zaznamenány zcela průkazné výsledky PCR u sfingomyelinázy. Důvodem proto byl pravděpodobně design primerů, které nebyly vhodně navrženy s ohledem na různorodost sekvencí pro daný gen. Při porovnání sekvence primerů se sekvencemi genu pro sfingomyelinázu, dostupných v databázi NCBI, byly nalezeny rozdíly v některých nukleotidech. To mohlo způsobit jejich špatné nasedání a nízký počet vzniklých ampliconů. Při vizualizaci byly bandy velice slabé a vznikaly také nespecifické PCR produkty. V tomto případě je optimalizace primerů pro sfingomyelinázu nutná.

Při prevenci je důležité vědět, že enterotoxiny jsou citlivé na vaření a podmínky v gastrointestinálním traktu. Jsou eliminovány zahříváním 20 min při 55 °C, kyselým pH 3,1 po dobu 20 min při 37 °C a jsou citlivé na proteázovou aktivitu pepsinu, trypsinu a chemotrypsinu (Granum et al. 1993). Prevence růstu a produkce toxinů *B. cereus* v potravinách je klíčem k tomu, aby nedocházelo k otrávám a aby byly zachovány standardy bezpečnosti potravin. Pro řízení bezpečnosti potravin se doporučuje chlazení při <4 °C a omezení vystavování vyšším zvýšeným teplotám. Pro inhibici růstu je vhodné okyselení potravinářských výrobků a snížení aktivity vody. Balení v modifikované atmosféře za nepřítomnosti kyslíku brání produkci cereulidu, ale může naopak stimulovat produkci enterotoxinů (Ceuppens et al. 2011). Důležité je zaměřit se na rizikové potraviny, které byly zmíněny výše. U našich testovaných kmenů izolovaných z potravin byl patogenní profil velice podobný, a vzhledem k nízkému počtu testovaných kmenů se ani nedají porovnat rozdíly v produkci toxinových genů v závislosti na potravině.

Antimikrobiální aktivita byla prokázána u třech kmenů, přičemž nejvíce citlivý byl zástupce skupiny *B. cereus* CCM 2010. Pouze jeden kmen byl aktivní proti *Clostridium perfringens* DSMZ 11778 a proti *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 nebyla aktivita žádná. Je známo, že bakteriociny působí zejména proti grampozitivním a blízkce příbuzným bakteriím, protože jsou pro ně nejvíce konkurenční. Proto je pravděpodobné, že aktivní látka spadá právě do této skupiny antimikrobiálních látek. Ze známých bakteriocinů produkovaných bakteriemi skupiny *B. cereus* jsou proti *Listeria monocytogenes* aktivní hned tři: Thusin, Cereiny, a Ticiny.

Žádný z testovaných kmenů tedy pravděpodobně neprodukuje látku obdobné povahy. Z antibiotických látek má široké spektrum účinnosti Zwittermicin A. Pro konkrétnější výsledky by bylo potřeba povést detailnější analýzy. Všechny kmeny vykazující nějakou antimikrobiální aktivitu byly zároveň hemolytické a pro využití ve farmacii tedy méně vhodné.

## 7 Závěr

Při testování toxigenního profilu se většina kmenů projevovala stejně. Kmeny byly izolovány částečně z krmiv, částečně z potravin, ale svou patogenní aktivitou byly vzájemně dosti podobné. Vliv potravin, ze které byly kmeny izolovány, nebyl tedy zpozorován. Většina kmenů byla identifikována jako *B. cereus sensu stricto* a malá část také jako *B. thuringiensis*. U obou druhů bylo potvrzeno patogenní působení. Projevily se hemolytickou i lecitinázovou aktivitou a byly u nich potvrzeny patogenní geny pro průjmová onemocnění. Studium patogenních vlastností může ale napomoci k lepší kontrole nad těmito organizmy v potravinářství. Při testování antimikrobiální aktivity byl potvrzen předpoklad, že nejvíce inhibovány budou blízké příbuzné druhy. Růst sbírkového kmene *B. cereus* CCM 2010 byl inhibován ve třech případech z 25. Zajímavou vlastností některých kmenů *B. cereus sensu lato* je schopnost inhibovat quorum sensing jiných, pro člověka patogenních, bakterií. Tato schopnost byla zjištěna u dvou kmenů, které budou dále studovány. Do budoucna se uvažuje o využití této vlastnosti a také o využití antimikrobiální aktivity ve farmaceutickém i potravinářském průmyslu. Problémem je ale patogenní působení většiny kmenů *B. cereus sensu lato*. Proto by bylo vhodné zaměřit se na nepatogenní kmeny. Další možností je vyjmutí genů pro faktory virulence anebo přenesení genů kódujících antimikrobiální látky do jiných organismů bez patogenního potenciálu. Zkoumání těchto možností by do budoucna mohlo být velkým přínosem jak v medicíně, tak v potravinářství.



## 8 Literatura

- Abdelmalek N, Sellami S, BenKridis A, Tounsi S, Rouis S. 2015. Molecular characterisation of *Bacillus thuringiensis* strain MEB4 highly toxic to the Mediterranean flour moth *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). *Pest Management Science* **72**:913–921.
- Abdulmawjood A, Herrmann J, Riede S, Jimenez G, Becker A, Breves G. 2019. Evaluation of enterotoxin gene expression and enterotoxin production capacity of the probiotic strain *Bacillus toyonensis* BCT–7112T. *PLoS one* **14** e0214536.
- Abriouel H, Franz CM, Omar NB, Gálvez A. 2011. Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *FEMS microbiology reviews* **35**:1201–232.
- Afchain AL, Carlin F, Nguyen-The C, Albert I. 2008. Improving quantitative exposure assessment by considering genetic diversity of *B. cereus* in cooked, pasteurised and chilled foods. *International Journal of Food Microbiology* **128**:165–173.
- Agata N, Ohta M, Mori M, Isobe M. 1995. A novel dodecadepsipeptide, cereulide, is an emetic toxin of *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiology Letters* **129**:17–20.
- Agata N, Ohta M, Yokoyama K. 2002. Production of *Bacillus cereus* emetic toxin (cereulide) in various foods. *International Journal of Food Microbiology* **73**:23–27.
- Ahern M, Verschueren S, van Sinderen D. 2003. Isolation and characterization of a novel bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* strain B439. *FEMS Microbiology Letters* **220**: 127–131.
- Alouf JE, Billington SJ, Jost BH. 2005. Repertoire and General Features of the Family of Cholesterol-Dependent Cytolysins. pp. 643–658. Academic Press, London UK.
- Altayar M, Sutherland AD. 2006. *Bacillus cereus* is common in the environment but emetic toxin producing isolates are rare. *Journal of Applied Microbiology* **100**:7–14.
- Ambrosini A, Stefanski T, Lisboa BB, Beneduzi A, Vargas LK, Passaglia LMP. 2016. Diazotrophic bacilli isolated from the sunflower rhizosphere and the potential of *Bacillus mycoides* B38V as biofertiliser. *Annals of Applied Biology* **168**: 93–110.
- Andersson MA, Jaaskelainen EL, Shaheen R, Pirhonen T, WijnandsLM, 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**:175–183.
- Andreeva Z, Nesterenko VF, Yurkov IS, Budarina ZI, Sineva EV, Solonin AS. 2006. Purification and cytotoxic properties of *Bacillus cereus* hemolysin II. *Protein Expression and Purification*. **47**: 186–193.
- Andreeva-Kovalevskaya ZI, Solonin AS, Sineva EV, Ternovsky VI. 2008. Pore-forming proteins and adaptation of living organisms to environmental conditions. *Biochemistry* **73**: 1473–1492.
- Antunes LC, Ferreira RB. 2009. Intercellular communication in bacteria. *Critical Reviews in Microbiology* **35**:69–80.

- Aragon-Alegro LC, Palcich G, Lopes GV, Ribeiro VB, Landgraf M, Destro MT. 2008. Enterotoxigenic and genetic profiles of *Bacillus cereus* strains of food origin in Brazil. *Journal of Food Protection* **71**:2115–2118.
- Arolas JL, Goulas T, Pomerantsev AP, Leppla SH, Gomis-Rüth FX. 2016. Structural basis for latency and function of immune inhibitor A metallopeptidase, a modulator of the *Bacillus anthracis* secretome. *Structure* **24**:25-36.
- Auger S, Krin E, Aymerich S, Gohar M. 2006. Autoinducer 2 affects biofilm formation by *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology* **72**:937–941.
- Auger S, Galleron N, Bidnenko E, Ehrlich SD, Lapidus A, Sorokin A. 2008. The genetically remote pathogenic strain NVH391-98 of the *Bacillus cereus* group is representative of a cluster of thermophilic strains. *Applied and Environmental Microbiology* **74**: 1276–1280.
- Baida GE, Kuzmin NP. 1995. Cloning and primary structure of a new hemolysin gene from *Bacillus cereus*. *Biochimica et Biophysica Acta* **1264**: 151–154.
- Baida GE, Kuzmin NP. 1996. Mechanism of action of hemolysin III from *Bacillus cereus*. *Biochimica et Biophysica Acta* **1284**: 122–124.
- Baida G, Budarina ZI, Kuzmin NP, Solonin AS. 1999. Complete nucleotide sequence and molecular characterization of hemolysin II gene from *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiology Letters*. **180**:7–14.
- Ball DA, Taylor R, Todd SJ, Redmond C, Couture-Tosi E, Sylvestre P, Moir A, Bullough PA. 2008. Structure of the exosporium and sublayers of spores of the *Bacillus cereus* family revealed by electron crystallography. *Molecular Microbiology* **68**:947–958.
- Bargabus R, Zidack N, Sherwood J, Jacobsen B. 2002. Characterisation of systemic resistance in sugar beet elicited by a non-pathogenic, phyllosphere-colonizing *Bacillus mycoides*, biological control agent. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **61**: 289–298.
- Barnaby W. 2002. *The Plague Makers: The Secret World of Biological Warfare*. Vision, London.
- Basi-Chipalu S, Dischinger J, Josten M, Szekat C, Zweynert A, Sahl HG, Bierbaum G. 2015. Pseudomycoicidin, a class II lantibiotic from *Bacillus pseudomycoides*. *Applied and Environmental Microbiology* **81**:3419-3429.
- Bassler BL, Losick R. 2006; Bacterially speaking. *Cell* **125**:237–246.
- Béchet M, Caradec T, Hussein W, Abderrahmani A, Chollet M, Leclère V, Jacques P. 2012. Structure, biosynthesis, and properties of kurstakins, nonribosomal lipopeptides from *Bacillus* spp. *Applied microbiology and biotechnology* **95**: 593–600.
- Beecher DJ, MacMillan JD. 1990. A novel bicomponent hemolysin from *Bacillus cereus*. *Infection and Immunity* **58**:2220–2227.
- Beecher DJ, MacMillan JD. 1991. Characterization of the components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Infection and Immunity* **59**:1778–1784.

- Beecher DJ, Schoeni JL, Wong AC. 1995. Enterotoxic activity of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Infection and Immunity* **63**:4423–4428.
- Beecher DJ, Wong AC. 1997. Tripartite hemolysin BL from *Bacillus cereus*. Hemolytic analysis of component interactions and a model for its characteristic paradoxical zone phenomenon. *The Journal of Biological Chemistry* **272**:233–239.
- Beecher DJ, Wong AC. 2000. Cooperative, synergistic and antagonistic haemolytic interactions between haemolysin BL, phosphatidylcholine phospholipase C and sphingomyelinase from *Bacillus cereus*. *Microbiology* **146**:3033–3039.
- Beecher DJ, Olsen TW, Somers EB, Wong AC. 2000. Evidence for contribution of tripartite hemolysin BL, phosphatidylcholine-preferring phospholipase C, and collagenase to virulence of *Bacillus cereus* endophthalmitis. *Infection and Immunity* **68**:5269–5276.
- Belguesmia Y, Naghmouchi K, Chihib NE, Drider D. 2011. Class IIa Bacteriocins: Current Knowledge and Perspectives. *Prokaryotic Antimicrobial Peptides* pp. 171-195. Springer, United States.
- Berliner E. 1915. Über die Schlafsucht der Mehlmottenraupe (*Ephestia kuhniella*, Zell.) ihren Erreger, *Bacillus thuringiensis* sp. *Zeitschrift für Angewandte Entomologie* **2**:29–56.
- Bernheimer AW, Grushoff P. 1967. Cereolysin: Production, purification and partial characterization. *Journal of General Microbiology* **46**: 143–150.
- Bhunja AK. 2018. Foodborne microbial pathogens: mechanisms and pathogenesis. Springer.
- Bizani D, Motta AS, Morrissy JA, Terra R, Souto AA, Brandelli A. 2005. Antibacterial activity of cerein 8A, a bacteriocin-like peptide produced by *Bacillus cereus*. *International Microbiology* **8**:125–131.
- Bonerba E, Di Pinto A, Novello L, Montemurro F, Terio V, Colao V, Ciccarese G, Tantillo G. 2010. Detection of potentially enterotoxigenic food-related *Bacillus cereus* by PCR analysis. *International Journal of Food Science & Technology* **45**:1310–1315.
- Boonchai N, Asano SI, Bando H, Wiwat C. 2008. Study on cytotoxicity and nucleotide sequences of enterotoxin FM of *Bacillus cereus* isolated from various food sources. *Journal of the Medical Association of Thailand* **91**:1425–1432.
- Bottone EJ. 2010. *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. *Clinical Microbiology Reviews* **23**:382–398.
- Brackman G, Coenye T. 2015. Quorum sensing inhibitors as antibiofilm agents. *Current Pharmaceutical Design* **21**:5–11.
- Brézillon C, Haustant M, Dupke S, Corre JP, Lander A, Franz T, Monot M, Couture-Tosi E, Jouvion G, Leendertz FH, Grunow R, Mock ME, Klee SR, Goossens PL. 2015. Capsules, toxins and AtxA as virulence factors of emerging *Bacillus cereus* biovar anthracis. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **9**:4 e0003455.
- Cadot C, Tran SL, Vignaud ML, De Buyser ML, Kolsto AB, Brisabois A, Nguyen-The C, Lereclus D, Guinebretiere MH, Ramarao N. 2010. InhA1, NprA, and HlyII as candidates

- for markers to differentiate pathogenic from nonpathogenic *Bacillus cereus* strains. *Journal of Clinical Microbiology* **48**:1358–1365.
- Cai X, Wang R, Filloux A, Waksman G, Meng G. 2011. Structural and functional characterization of *Pseudomonas aeruginosa* CupB chaperones. *PLoS ONE* **6**:16583.
- Callegan MC, Jett BD, Hancock LE, Gilmore MS. 1999. Role of hemolysin BL in the pathogenesis of extraintestinal *Bacillus cereus* infection assessed in an endophthalmitis model. *Infection and Immunity* **67**:3357–66.
- Cao JG, Meighen EA. 1989. Purification and structural identification of an autoinducer for the luminescence system of *Vibrio harveyi*. *Journal of Biological Chemistry* **264**:21670–21676.
- Carlin F, Fricker M, Pielaat A, Heisterkamp S, Shaheen R, Salonen MS, Svensson B, Nguyen-The C, Ehling-Schulz M. 2006. Emetic toxin-producing strains of *Bacillus cereus* show distinct characteristics within the *Bacillus cereus* group. *International Journal of Food Microbiology* **109**:132–138.
- Ceuppens S, Rajkovic A, Heyndrickx M, Tsilia V, Van De Wiele T, Boon N, Uyttendaele M. 2011. Regulation of toxin production by *Bacillus cereus* and its food safety implications. *Critical reviews in microbiology* **37**:188-213.
- Chan KG, Wong CS, Yin WF, Sam CK, Koh CL. 2010. Rapid degradation of N-3-oxo-acylhomoserine lactones by a *Bacillus cereus* isolate from Malaysian rainforest soil. *Antonie Van Leeuwenhoek* **98**: 299–305.
- Charlton S, Moir AJ, Baillie L, Moir A. 1999. Characterization of the exosporium of *Bacillus cereus*. *Journal of Applied Microbiology* **87**:241–245.
- Chehimi S, Delalande F, Sable S, Hajlaoui MR, Van Dorsselaer A, Limam F, Pons AM. 2007. Purification and partial amino acid sequence of thuricin S, a new anti-*Listeria* bacteriocin from *Bacillus thuringiensis*. *Canadian Journal of Microbiology* **53**: 284–290.
- Chen R, Zhou Z, Cao Y, Yao B. 2010. High yield expression of an AHL-lactonase from *Bacillus* sp. B546 in *Pichia pastoris* and its application to reduce *Aeromonas hydrophila* mortality in aquaculture. *Microbial Cell Factories* **9**:39.
- Chen F, Gao Y, Chen X, Yu Z, Li X. 2013. Quorum quenching enzymes and their application in degrading signal molecules to block quorum sensing-dependent infection. *International Journal of Molecular Sciences* **14**:17477–17500.
- Chorin E, Thuault D, Cleret JJ, Bourgeois CM. 1997. Modelling *Bacillus cereus* growth. *International journal of food mikrobiologie* **38**:229-234.
- Chu W, Lu F, Zhu W, Kang C. 2010. Isolation and characterization of new potential probiotic bacteria based on quorum-sensing system. *Journal of Applied Microbiology* **110**:202–208.
- Chung MC, Popova TG, Millis BA, Mukherjee DV, Zhou W, Liotta LA. 2006. Secreted neutral metalloproteases of *Bacillus anthracis* as candidate pathogenic factors. *Journal of Biological Chemistry* **281**:31408–31418.

- Claus D, Berkeley RCW. 1986. Genus *Bacillus*. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2 (Sneath PHA, ed), pp. 1105–1139. Williams, Wilkins, Baltimore, MD.
- Cleveland J, Montville TJ, Nes IF, Chikindas ML. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology* **71**:1–20.
- Cohn FJ. 1876. Untersuchungen über bakterien. Beiträge zur Biologie einiger geokarper Pflanzen **2**:249–276.
- Cuozzo S, Sesma F. 2001. Methods for the detection and concentration of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Food Microbiology* **14**:141–146.
- ČSN EN ISO 7932. 2005. Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda stanovení počtu presumptivního *Bacillus cereus* – Technika počítání kolonií vykultivovaných při 30 °C. Český normalizační institut, Praha.
- de la Fuente-Salcido NM, Casados-Vázquez LE, Barboza-Corona JE. 2013. Bacteriocins of *Bacillus thuringiensis* can expand the potential of this bacterium to other areas rather than limit its use only as microbial insecticide. *Canadian Journal of Microbiol* **59**:515–522.
- de Vries YP, Hornstra LM, de Vos WM, Abee T. 2004. Growth and sporulation of *Bacillus cereus* ATCC 14579 under defined conditions: temporal expression of genes for key sigma factors. *Applied and environmental microbiology* **70**:2514–2519.
- Declerck N, Bouillaut L, Chaix D, Rugani N, Slamti L, Hoh F, Lereclus D, Arold ST. 2007. Structure of PlcR: Insights into virulence regulation and evolution of quorum sensing in Gram-positive bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **104**:18490–18495.
- Delalande L, Faure D, Raffoux A, Uroz S, D'Angelo-Picard C, Elasmri M, Dessaux Y. 2005. N-hexanoyl-L-homoserine lactone, a mediator of bacterial quorum-sensing regulation, exhibits plant-dependent stability and may be inactivated by germinating *Lotus corniculatus* seedlings. *FEMS microbiology ecology* **52**:13–20.
- Di Cagno R, De Angelis M, Calasso M, Gobbetti M. 2011. Proteomics of the bacterial cross-talk by quorum sensing. *Journal of Proteome Research* **74**:19–34.
- Di Franco C, Beccari E, Santini T, Pisaneschi G, Tecce G. 2002. Colony shape as a genetic trait in the pattern-forming *Bacillus mycoides*. *BMC Microbiology* **2**:33.
- Didier A, Dietrich R, Gruber S, Bock S, Moravek M, Nakamura T. 2012. Monoclonal antibodies neutralize *Bacillus cereus* Nhe enterotoxin by inhibiting ordered binding of its three exoprotein components. *Infection and Immunity* **80**:832–8.
- Dierick K, Van Coillie E, Swiecicka I, Meyfroidt G, Devlieger H, Meulemans A, Hoedemaekers G, Fourie L, Heyndrickx M, Mahillon J. 2005. Fatal family outbreak of *Bacillus cereus*-associated food poisoning. *Journal of Clinical Microbiology* **43**:4277–4279.
- Dischinger J, Basi Chipalu S, Bierbaum G. 2014. Lantibiotics: promising candidates for future applications in health care. *International Journal of Medical Microbiology* **304**:51–62.

- Doll VM, Ehling-Schulz M, Vogelmann R. 2013. Concerted action of sphingomyelinase and non-hemolytic enterotoxin in pathogenic *Bacillus cereus*. PLoS One **8**:4 e61404.
- Dong YH, Xu JL, Li XZ, Zhang LH. 2000. AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA **97**:3526–3531.
- Dong YH, Wang LH, Xu JL, Zhang HB, Zhang XF, Zhang LH. 2001. Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an N-acyl homoserine lactonase. Nature **411**:813–817.
- Dong YH, Gusti AR, Zhang Q, Xu JL, Zhang LH. 2002. Identification of quorum-quenching N-acyl homoserine lactonases from *Bacillus* species. Applied and environmental microbiology **68**:1754-1759.
- Dong YH, Wang LH, Zhang LH. 2007. Quorumquenching microbial infections: Mechanisms and implications. Philosophical Transactions of the Royal Society **362**:1201–1211.
- Dubois T, Faegri K, Perchat S, Lemy C, Buisson C, Nielsen-LeRoux C, Gohar M, Jacques P, Ramarao N, Kolstø AB, Lereclus D. 2012. Necrotrophism is a quorum-sensing-regulated lifestyle in *Bacillus thuringiensis*. PLoS Pathog **8**:1002629
- Dutta S, Rani TS, Podile AR. 2013. Root exudate-induced alterations in *Bacillus cereus* cell wall contribute to root colonization and plant growth promotion. PLoS One **8**:10 e78369.
- EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). 2016. Risks for public health related to the presence of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. including *Bacillus thuringiensis* in foodstuffs. EFSA Journal **14**:7.
- Ehling-Schulz M, Fricker M, Scherer S. 2004. *Bacillus cereus*, the causative agent of an emetic type of food-borne illness. Molecular Nutrition & Food Research **48**:479–487.
- Ehling-Schulz M, Svensson B, Guinebretiere MH, Lindbäck T, Andersson M, Schulz A, Fricker M, Christiansson A, Granum PE, 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, Märtlbauer 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**:105–113.
- Ehling-Schulz M, Fricker M, Grallert H, Rieck P, Wagner M, Scherer S. 2006. Cereulide synthetase gene cluster from emetic *Bacillus cereus*: structure and location on a mega virulence plasmid related to *Bacillus anthracis* toxin plasmid pXO1. BMC Microbiology **6**:20
- Ehling-Schulz M, Knutsson R, Scherer S. 2011. *Bacillus cereus*. Pages 147–164 in Genomes of Foodborne and Waterborne Pathogens, editor. American society of Microbiology. Washington D.C, USA.

- Ehling-Schulz M, Koehler TM, Lereclus D. 2019. The *Bacillus cereus* group: *Bacillus* species with pathogenic potential. *Microbiology spectrum* **7**:3.
- Fagerlund A, Brillard J, Fürst R, Guinebretière MH, Granum PE. 2007. Toxin production in a rare and genetically remote cluster of strains of the *Bacillus cereus* group. *BMC Microbiology* **7**: 43.
- Fagerlund A, Lindbäck T, Storset AK, Granum PE, Hardy SP. 2008. *Bacillus cereus* Nhe is a pore-forming toxin with structural and functional properties similar to the ClyA (HlyE, SheA) family of haemolysins, able to induce osmotic lysis in epithelia. *Microbiology* **154**:693–704.
- Faille C, Tauveron G, Le Gentil-Lelievre C, Slomianny C. 2007. Occurrence of *Bacillus cereus* spores with a damaged exosporium: consequences on the spore adhesion on surfaces of food processing lines. *Journal of Food Protection* **70**:2346–53.
- Fedhila S, Gohar M, Slamti L, Nel P, Lereclus D. 2003. The *Bacillus thuringiensis* PlcR-regulated gene inhA2 is necessary, but not sufficient, for virulence. *Journal of Bacteriology* **185**:2820–2825.
- Firth JD, Putnins EE, Larjava H, Uitto VJ. 1997. Bacterial phospholipase C upregulates matrix metalloproteinase expression by cultured epithelial cells. *Infection and Immunity* **65**:4931–4936.
- Fletcher P, Logan NA. 1999. Improved cytotoxicity assay for *Bacillus cereus* diarrhoeal enterotoxin. *Letters in Applied Microbiology* **28**: 394–400.
- Frankland GC, Frankland PF. 1887. Studies on some new micro-organisms obtained from air. *Philosophical Transactions of the Royal Society* **178**:257–287.
- Frederiksen K, Rosenquist H, Jorgensen K, Wilcks A. 2006. Occurrence of natural *Bacillus thuringiensis* contaminants and residues of *Bacillus thuringiensis*-based insecticides on fresh fruits and vegetables. *Applied and Environmental Microbiology* **72**:3435–3440.
- Frenzel E, Letzel T, Scherer S, Ehling-Schulz M. 2011. Inhibition of cereulide toxin synthesis by emetic *Bacillus cereus* via long-chain polyphosphates. *Applied and Environmental Microbiology* **77**:1475–1482.
- Fricke M, Messelhäusser U, Busch U, Scherer S, Ehling-Schulz M. 2007. Diagnostic real-time PCR assays for the detection of emetic *Bacillus cereus* strains in foods and recent food-borne outbreaks. *Applied and Environmental Microbiology* **73**:1892–1898.
- Fujii S, Inoue B, Yamamoto H, Ogata K, Shinki T, Inoue S. 1998. Mg<sup>2+</sup> binding and catalytic function of sphingomyelinase from *Bacillus cereus*. *Journal of Biochemistry* **124**:1178–1187.
- Fuqua C, Winans SC. 1996. Conserved cis-acting promoter elements are required for density-dependent transcription of *Agrobacterium tumefaciens* conjugal transfer genes. *Journal of Bacteriology* **178**:435–440.

- Ghelardi E, Celandroni F, Salvetti S, Ceragioli M, Beecher DJ, Senesi S, Wong AC. 2007. Swarming behavior of and hemolysin BL secretion by *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology* **73**:4089–4093.
- Gilbert RJ, Kramer JM. 1986. *Bacillus cereus* food poisoning. *Progress in Food Safety (Proceedings of Symposium)* (Cliver DC & Cochrane BA, eds), pp. 85–93. Food Research Institute, University of Wisconsin-Madison, Madison, WI.
- Gilmore MS, Cruzrodz AL, Leimesterwachter M, Kreft J, Goebel W. 1989. A *Bacillus cereus* cytolytic determinant, cereolysin-AB, which comprises the phospholipase-C and sphingomyelinase genes-nucleotide-sequence and genetic linkage. *Journal of Bacteriology*. **171**:744–753.
- Gohar M, Okstad OA, Gilois N, Sanchis V, Kolsto AB, Lereclus D. 2002. Two-dimensional electrophoresis analysis of the extracellular proteome of *Bacillus cereus* reveals the importance of the PlcR regulon. *Proteomics* **2**:784–791.
- Gohar M, Faegri K, Perchat S, Ravnum S, Økstad OA, Gominet M, Kolstø AB, Lereclus D. 2008. The PlcR virulence regulon of *Bacillus cereus*. *PLoS One* **3**:7 e2793.
- Goldberg LH, Margalit J. 1977. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. *Mosque News* **37**:355–358.
- Grandclément C, Tannières M, Moréra S, Dessaux Y, Faure D. 2016. Quorum quenching: role in nature and applied developments. *FEMS Microbiology Reviews* **40**:86–116.
- Granum PE, Brynestad S, Osullivan K, Nissen K. 1993. Enterotoxin from *Bacillus cereus*: production and biochemical characterization. *Netherlands Milk and Dairy Journal* **47**:63–70.
- Granum PE. 2007. *Bacillus cereus*. Pages 445–455 in Doyle MP, Beuchat LR, editors. *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. ASM Press, Washington DC.
- Griffith OH, Ryan M. 1999. Bacterial phosphatidylinositol-specific phospholipase C: structure, function, and interaction with lipids. *Biochimica et Biophysica Acta* **1441**:237–254.
- Guillemet E, Cadot C, Tran SL, Guinebretière MH, Lereclus D, Ramarao N. 2010. The InhA metalloproteases of *Bacillus cereus* contribute concomitantly to virulence. *Journal of Bacteriology* **192**:286–294.
- Guinebretière MH, Broussolle V, Nguyen-The C. 2002. Enterotoxigenic profiles of food-poisoning and food-borne *Bacillus cereus* strains. *Journal of Clinical Microbiology* **40**:3053–3056.
- Guinebretière MH, Auger S, Galleron N, Contzen M, De Sarrau B, De Buyser ML, Lamberet G, Fagerlund A, Granum PE, Lereclus D, De Vos P, Nguyen-The C, Sorokin A. 2013. *Bacillus cytotoxicus* sp. nov. is a novel thermotolerant species of the *Bacillus cereus* Group occasionally associated with food poisoning. *International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology* **63**:31–40.



- Hancock RE, Chapple DS. 1999. Peptide antibiotics. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **43**:1317–1323.
- Hägglblom MM, Apetroaie C, Andersson MA, Salkinoja-Salonen MS. 2002. Quantitative analysis of cereulide, the emetic toxin of *Bacillus cereus*, produced under various conditions. *Applied and Environmental Microbiology* **68**:2479–2483.
- Hardy SP, Lund T, Granum PE. 2001. CytK toxin of *Bacillus cereus* forms pores in planar lipid bilayers and is cytotoxic to intestinal epithelia. *FEMS Microbiology Letters* **197**:47–51.
- Harshey RM. 2003. Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. *Annual Review of Microbiology* **57**:249–273.
- Heilkenbrinker U, Dietrich R, Didier A, Zhu K, Lindback T, Granum PE. 2013. Complex formation between NheB and NheC is necessary to induce cytotoxic activity by the threecomponent *Bacillus cereus* Nhe enterotoxin. *PLoS One* **8**:63104.
- Heinz DW, Ryan M, Smith MP, Weaver LH, Keana JF, Griffith OH. 1996. Crystal structure of phosphatidylinositol-specific phospholipase C from *Bacillus cereus* in complex with glucosaminyl( $\alpha$ 1-6)-D-myo-inositol, an essential fragment of GPI anchors. *Biochemistry* **35**:9496–9504.
- Hendriksen NB and Hansen BM, 2006. Detection of *Bacillus thuringiensis* kurstaki HD1 on cabbage for human consumption. *FEMS Microbiology Letters* **257**:106–111.
- Hofmann K, Stoffel W. 1993. TMbase – A database of membrane spanning proteins segments. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* **374**:166.
- Hoffmaster AR, Ravel J, Rasko DA, Chapman GD, Chute MD, Marston CK, De BK, Sacchi CT, Fitzgerald C, Mayer LW, Maiden MC, Priest FG, Barker M, Jiang L, Cer RZ, Rilstone J, Peterson SN, Weyant RS, Galloway DR, Read TD, Popovic T, Fraser CM. 2004. Identification of anthrax toxin genes in a *Bacillus cereus* associated with an illness resembling inhalation anthrax. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **101**:8449–8454.
- Hong HA, Duc Le H, Cutting SM. 2005. The use of bacterial spore formers as probiotics. *FEMS Microbiology Reviews* **29**:813–835.
- Hoton FM, Fornelos N, N'Guessan E, Hu X, Swiecicka I, Dierick K, Jääskeläinen E, Salkinoja-Salonen M, Mahillon J. 2009. Family portrait of *Bacillus cereus* and *Bacillus weihenstephanensis* cereulide-producing strains. *Environmental Microbiology Reports* **1**:177–183.
- Huillet E, Gohar M, Micalis U. 2016. Quorum sensing in *Bacillus cereus* in relation with cysteine metabolism and oxidative stress response. *Stress and Environmental Regulation of Gene Expression and Adaptation in Bacteria* **2**:1242–1251.
- Huma N, Shankar P, Kushwah J, Bhushan A, Joshi J, Mukherjee T, Kalia VC. 2011. Diversity and polymorphism in AHL-lactonase gene (aiiA) of *Bacillus*. *Journal of Microbiology Biotechnology* **21**:1001–1011.

- Hwang JY, Park JH. 2015. Characteristics of enterotoxin distribution, hemolysis, lecithinase, and starch hydrolysis of *Bacillus cereus* isolated from infant formulas and ready-to-eat foods. *Journal of dairy science*, 98(3), 1652-1660.
- Isobe M, Ishikawa T, Suwan S, Agata N, Ohta M. 1995. Synthesis and activity of cereulide, a cyclic dodecadepsipeptide ionophore as emetic toxin from *Bacillus cereus*. *Bioorganic & Medicinal Chemical Letters* 5:2855–2858.
- Jack RW, Tagg JR, Ray B. 1995. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiological Review* 59: 171–200.
- Jackson SG, Goodbrand RB, Ahmed R and Kasatiya S. 1995. *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolated in a gastroenteritis outbreak investigation. *Letters in Applied Microbiology* 21:103–105.
- Jacobs T, Cima-Cabal MD, Darji A, Méndez FJ, Vázquez F, Jacobs AA, Shimada Y, Ohno-Iwashita Y, Weiss S, de los Toyos JR. 1999. The conserved undecapeptide shared by thiol-activated cytolysins is involved in membrane binding. *FEBS Letters* 459:463–466.
- Jacques P. 2011. Surfactin and other lipopeptides from *Bacillus* spp. Pages 57–91 in Soberon-Chavez G, editors. *Biosurfactants microbiology monographs*, vol 20. Springer, Berlin.
- Jain D, Saharan V, Pareek S. 2016. Current status of *Bacillus thuringiensis*: insecticidal crystal proteins and transgenic crops in advances in plant breeding strategies: agronomic, abiotic and biotic stress traits. pp. 657–698. Springer International Publishing, New York.
- Jensen GB, Hansen BM, Eilenberg J, Mahillon J. 2003. The hidden lifestyles of *Bacillus cereus* and relatives. *Environmental Microbiology* 5:631–640.
- Jeßberger N, Dietrich R, Bock S, Didier A, Märklbauer E. 2014. *Bacillus cereus* enterotoxins act as major virulence factors and exhibit distinct cytotoxicity to different human cell lines. *Toxicon* 77:49–57.
- Jeßberger N, Krey VM, Rademacher C, Böhm ME, Mohr AK, Ehling-Schulz M, Scherer S, Märklbauer E. 2015. From genome to toxicity: a combinatory approach highlights the complexity of enterotoxin production in *Bacillus cereus*. *Frontiers in Microbiology* 6:560.
- Jeßberger N, Rademacher C, Krey VM, Dietrich R, Mohr AK, Böhm ME, Scherer S, Ehling-Schulz M, Märklbauer E. 2017. Simulating Intestinal Growth Conditions Enhances Toxin Production of Enteropathogenic *Bacillus cereus*. *Frontiers in Microbiology* 8:627.
- Jiménez G, Urdiain M, Cifuentes A, Lopez-Lopez A, Blanch AR, Tamames J. 2013a. Description of *Bacillus toyonensis* sp. nov., a novel species of the *Bacillus cereus* group, and pairwise genome comparisons of the species of the group by means of ANI calculations. *Systematic and Applied Microbiology* 36:383–91.
- Jiménez G, Blanch AR, Tamames J, Rosselló-Mora R. 2013b. Complete genome sequence of *Bacillus toyonensis* BCT-7112T, the active ingredient of the feed additive preparation Toyocerin. *Genome Announcements* 1:01080-13.
- Kalia VC, Purohit HJ. 2008. Microbial diversity and genomics in aid of bioenergy. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 35:403–419.

- Kalia VC, Purohit HJ. 2011. Quenching the quorum sensing system: Potential antibacterial drug targets. *Critical Reviews in Microbiology* **37**:121–140.
- Kalia VC, Raju SC, Purohit HJ. 2011. Genomic analysis reveals versatile organisms for quorum quenching enzymes: Acyl-homoserine lactone-acylase and lactonase. *Open Microbiology Journal* **5**:1–13.
- Kailas L, Terry C, Abbott N, Taylor R, Mullin N, Tzokov SB. 2011. Surface architecture of endospores of the *Bacillus cereus/ anthracis/thuringiensis* family at the subnanometer scale. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **108**:16014–16019.
- Kareb O, Aïder M. 2019. Quorum sensing circuits in the communicating mechanisms of bacteria and its implication in the biosynthesis of bacteriocins by lactic acid bacteria: a review. *Probiotics and antimicrobial proteins* **12**:5–17.
- Keppie J, Harris-Smith PW, Smith H. 1963. The chemical basis of the virulence of *Bacillus anthracis*. IX. Its aggressins and their mode of action. *British Journal of Experimental Pathology* **44**:446–453.
- Kevany BM, Rasko DA, Thomas MG. 2009. Characterization of the complete zwittermicin A biosynthesis gene cluster from *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology* **75**: 1144–1155.
- Kim JB, Kim JM, Kim SY, Kim JH, Park YB, Choi NJ, Oh DH. 2010. Comparison of enterotoxin production and phenotypic characteristics between emetic and enterotoxic *Bacillus cereus*. *Journal of Food Protection* **73**:1219–1224.
- Klichko VI, Miller J, Wu A, Popov SG, Alibek K. 2003. Anaerobic induction of *Bacillus anthracis* hemolytic activity. *Biochemical and biophysical research communications* **303**:855-862.
- Knerr PJ, van der Donk WA. 2012. Discovery, biosynthesis, and engineering of lantipeptides. *Annual Review of Biochemistry* **81**:479–505.
- Koch R. 1876. Die Ätiologie der Milzbrand-Krankheit, begründet auf die Entwicklungsgeschichte des *Bacillus anthracis*. *Beiträge zur Biologie der Pflanzen* **2**:277–310.
- Koch C, Høiby N. 2000. Diagnosis and treatment of cystic fibrosis. *Respiration* **67**:239–247.
- Kotiranta A, Lounatmaa K, Haapasalo M. 2000. Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. *Microbes and Infection* **2**:189–198.
- Kramer JM, Gilbert RJ. 1989. *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. *Foodborne Bacterial Pathogens* (Doyle MP, ed), pp. 21–70. Marcel Dekker, New York.
- Kumariya R, Garsa AK, Rajput YS, Sood SK, Akhtar N, Patel S. 2019. Bacteriocins: Classification, synthesis, mechanism of action and resistance development in food spoilage causing bacteria. *Microbial pathogenesis* **128**:171–177.
- Lacey LA, Frutos R, Kaya HK, Vail P. 2015. Insect pathogens as biological control agents: back to the future. *Journal of Invertebrate Pathology* **132**:1–41.

- Lane HC, Fauci AS. 2001. Bioterrorism on the home front: a new challenge for American medicine. *Journal of the American Medical Association* **286**:2595–2597.
- Lapidus A, Goltsman E, Auger S, Galleron N, Ségurens B, Dossat C, Land ML, Broussolle V, Brillard J, Guinebretiere MH, Sanchis V, Nguen-The C, Lereclus D, Richardson P, Wincker P, Weissenbach J, Ehrlich SD, Sorokin A. 2008. Extending the *Bacillus cereus* group genomics to putative food-borne pathogens of different toxicity. *Chemo-Biological Interactions* **171**:236–249.
- Larsen HD, Jørgensen K. 1999. Growth of *Bacillus cereus* in pasteurized milk products. *International Journal of Food Microbiology* **46**:173–176.
- Lechner S, Mayr R, Francis KP, Prüss BM, Kaplan T, Wiessner-Gunkel E, Stewart GS, Scherer S. 1998. *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. *International Journal of Systematic Bacteriology* **48**:1373–1382.
- Lee H, Churey JJ, Worobo RW. 2009. Biosynthesis and transcriptional analysis of thurincin H, a tandem repeated bacteriocin genetic locus, produced by *Bacillus thuringiensis* SF361. *FEMS Microbiology Letters* **299**:205–213.
- Lee H, Kim HY. 2011. Lantibiotics, class I bacteriocins from the genus *Bacillus*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **21**:229–35.
- Lin YH, Xu JL, Hu J, Wang LH, Ong SL, Leadbetter JR. 2003. Acyl-homoserine lactone acylase from *Ralstonia* strain XJ12B represents a novel and potent class of quorum-quenching enzymes. *Molecular Microbiology* **47**:849–860.
- Lindbäck T, Fagerlund A, Rødland MS, Granum PE. 2004. Characterization of the *Bacillus cereus* Nhe enterotoxin. *Microbiology* **150**:3959–3967.
- Liu Y, Lai Q, Göker M, Meier-Kolthoff JP, Wang M, Sun Y, Wang L, Shao Z. 2015. Genomic insights into the taxonomic status of the *Bacillus cereus* group. *Scientific Reports* **5**:14082.
- Liu Y, Lai Q, Shao Z. 2018. Genome analysis-based reclassification of *Bacillus weihenstephanensis* as a later heterotypic synonym of *Bacillus mycoides*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **68**:106–112.
- Logan NA, De Vos P. 2009. *Bacillus*. Pages 21–128 in De Vos P, Garrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Whitman WB, editors. *Bergey's manual of systematic bacteriology* (2nd ed., Vol. 3: the *Firmicutes*). Springer, New York.
- Lund T, Granum PE. 1996. Characterisation of a nonhaemolytic enterotoxin complex from *Bacillus cereus* isolated after a foodborne outbreak. *FEMS Microbiology Letters* **141**:151–156.
- Lund T, De Buyser ML, Granum P.E. 2000. A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. *Molecular Microbiology* **38**:254–261.
- Madegowda M, Eswaramoorthy S, Burley SK, Swaminathan S. 2008. X-ray crystal structure of the B component of Hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Proteins* **71**:534–540.

- Maget-Dana R, Peypoux F. 1994. Iturins, a special class of pore-forming lipopeptides: Biological and physicochemical properties. *Toxicology* **87**:151–174.
- Magnusson M, Svensson B, Kolstrup C, Christiansson A. 2007. *Bacillus cereus* in free-stall bedding. *Journal of Dairy Science* **90**:5473–5482.
- Mahillon J, Rezsöhazy R, Hallet B, Delcour J. 1994. IS231 and other *Bacillus thuringiensis* transposable elements: a review. *Genetica* **93**:13–26.
- Makino S, Watarai M, Cheun HI, Shirahata T, Uchida I. 2002. Effect of the lower molecular capsule released from the cell surface of *Bacillus anthracis* on the pathogenesis of anthrax. *Journal of Infectious Diseases* **186**:227–33.
- Mangold T, Goldberg J. 1999. *Plague Wars: A True Story of Biological Warfare*. Macmillan, London.
- Margulis L, Jorgensen JZ, Dolan S, Kolchinsky R, Rainey FA, Lo SC. 1998. The Arthromitus stage of *Bacillus cereus*: intestinal symbionts of animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **95**:1236–1241.
- Martin SF, Hergenrother PJ. 1999. Catalytic cycle of the phosphatidylcholine-preferring phospholipase C from *Bacillus cereus*. Solvent viscosity, deuterium isotope effects, and proton inventory studies. *Biochemistry* **38**:4403–4408.
- Marxen S, Stark TD, Rüttschle A, Lücking G, Frenzel E, Scherer S, Ehling-Schulz M, Hofmann T. 2015. Depsipeptide Intermediates Interrogate Proposed Biosynthesis of Cereulide, the Emetic Toxin of *Bacillus cereus*. *Scientific Reports* **5**:10637.
- Mavangira V, Angelos JA, Samitz EM, Rowe JD, Byrne BA. 2013. Gangrenous mastitis caused by *Bacillus* species in six goats. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **242**:836–843.
- McIntyre L, Bernard K, Beniac D, Isaac-Renton JL, Naseby DC. 2008. Identification of *Bacillus cereus* group species associated with food poisoning outbreaks in British Columbia, Canada. *Applied and Environmental Microbiology* **74**:7451–7453.
- McPherson M, Møller S. 2006. *Pcr*. Taylor & Francis Group, London.
- Melo AL, Soccol VT, Soccol CR. 2016. *Bacillus thuringiensis*: mechanism of action, resistance, and new applications: a review. *Critical Rev Biotechnol* **36**:317–326.
- Messelhäusser U, Kämpf P, Fricker M, Ehling-Schulz M, Zucker R, Wagner B, Busch U, Höller C. 2010. Prevalence of emetic *Bacillus cereus* in different ice creams in Bavaria. *Journal of food protection* **73**:395–399.
- Messelhäusser U, Frenzel E, Blöching C, Zucker R, Kämpf P, Ehling-Schulz M. 2014. Emetic *Bacillus cereus* are more volatile than thought: recent foodborne outbreaks and prevalence studies in Bavaria (2007–2013). *BioMed Research International* **2014**:465603.

- Mikkola R, Saris NE, Grigoriev PA, Andersson MA, Salkinoja-Salonen MS. 1999. Ionophoretic properties and mitochondrial effects of cereulide: the emetic toxin of *B. cereus*. *European Journal of Biochemistry* **263**:112–117.
- Mikkola R, Kolari M, Andersson MA, Helin J, Salkinoja-Salonen MS. 2000. Toxic lactonic lipopeptide from food poisoning isolates of *Bacillus licheniformis*. *European Journal of Biochemistry* **267**:4068–4074.
- Miles G, Bayley H, Cheley S. 2006. Properties of *Bacillus cereus* hemolysin II: A heptameric transmembrane pore. *Protein Science* **11**:1813–1824.
- Milner JL, Silo-Suh LAURA, Lee JC, He H, Clardy J, Handelsman JO. 1996. Production of kanosamine by *Bacillus cereus* UW85. *Applied and Environmental Microbiology* **62**:3061–3065.
- Modrie P, Beuls E, Mahillon J. 2010. Differential transfer dynamics of pAW63 plasmid among members of the *Bacillus cereus* group in food microcosms. *Journal of Applied Microbiology* **108**:888–897.
- Moir A. 2006. How do spores germinate? *Journal of Applied Microbiology* **101**:526–530.
- Moravek M, Dietrich R, Buerk C, Broussolle V, Guinebretière MH, Granum PE, Nguyen-The C, Märklbauer E. 2006. Determination of the toxic potential of *Bacillus cereus* isolates by quantitative enterotoxin analyses. *FEMS Microbiology Letters* **257**:293–298.
- Mukherjee DV, Tonry JH, Kim KS, Ramarao N, Popova TG, Bailey C, Popov S, Chung MC. 2011. *Bacillus anthracis* protease InhA increases blood-brain barrier permeability and contributes to cerebral hemorrhages. *PLoS One* **6**:17921.
- Nakamura LK. 1998. *Bacillus pseudomycooides* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **48**:1031–1035.
- Nakano MM, Zheng G, Zuber P. 2000. Dual control of sbo-alb operon expression by the Spo0 and ResDE systems of signal transduction under anaerobic conditions in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **182**:3274–3277.
- Neher OT, Johnston MR, Zidack NK, Jacobsen BJ. 2009. Evaluation of *Bacillus mycooides* isolate BmJ and *B. mojavensis* isolate 203-7 for the control of anthracnose of cucurbits caused by *Glomerella cingulata* var. *orbiculare*. *Biological Control* **48**:140–146.
- Ngamwongsatit P, Buasri W, Pianariyanon P, Pulsrikarn C, Ohba M, Assavanig A, Panbangred W. 2008. Broad distribution of enterotoxin genes (*hblCDA*, *nheABC*, *cytK*, and *entFM*) among *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* as shown by novel primers. *International Journal of Food Microbiology* **121**:352–356.
- Nissen-Meyer J, Nes IF. 1997. Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: Their function, structure, biogenesis, and mechanism of action. *Archives of Microbiology* **167**:67–77.
- Oscáriz JC, Pisabarro AG. 2000. Characterization and mechanism of action of cerein 7, a bacteriocin produced by *Bacillus cereus* Bc7. *Journal of Applied Microbiology* **89**:361–369.

- Oscáriz JC, Cintas L, Holo H, Lasa Í, Nes IF, Pisabarro AG. 2006. Purification and sequencing of cerein 7B, a novel bacteriocin produced by *Bacillus cereus* Bc7. *FEMS Microbiology Letters* **254**:108–115.
- Oren A, Garrity GM. 2014. Validation list no. 155. List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. *International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology* **64**:1–5.
- Østensvik Ø, From C, Heidenreich B, O'Sullivan K, Granum PE. 2004. Cytotoxic *Bacillus* spp. belonging to the *B. cereus* and *B. subtilis* groups in Norwegian surface waters. *Journal of Applied Microbiology* **96**:987–993.
- Ouoba LII, Thorsen L, Varnam, AH. (2008). Enterotoxins and emetic toxins production by *Bacillus cereus* and other species of *Bacillus* isolated from Soumbala and Bikalga, African alkaline fermented food condiments. *International Journal of Food Microbiology* **124**:224–230.
- Paananen A, Mikkola R, Sareneva T, Matikainen S, Hess M, Andersson M, Julkunen I, Salkinoja-Salonen MS, 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.
- Palmer M. 2001. The family of thiol-activated, cholesterol-binding cytolysins. *Toxicon* **39**:1681–1689.
- Papagianni M. 2003. Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: Biosynthesis, structure, function, and applications. *Biotechnology Advances* **21**:465–499.
- Parada JL, Caron CR, Medeiros ABP, Soccol CR. 2007. Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, properties and use as biopreservatives, *Brazilian Archives of Biology and Technology* **50**:521–542.
- Parisot J, Carey S, Breukink E, Chan WC, Narbad A, Bonev B. 2008. Molecular mechanism of target recognition by subtilin, a class I lanthionine antibiotic. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **52**:612–618.
- Park SY, Kang HO, Jang HS, Lee JK, Koo BT, Yum DY. 2005. Identification of extracellular N-acylhomoserine lactone acylase from a *Streptomyces* sp. and its application to quorum quenching. *Applied and Environmental Microbiology* **71**:2632–2641.
- Pasteur L. 1881. Le vaccin du charbon. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences* **92**:666–668.
- Rahmati T, Labbe R. 2008. Levels and toxigenicity of *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens* from retail seafood. *Journal of Food Protection* **71**:1178–1185.
- Rajkovic A, Uyttendaele M, Ombregt SA, Jääskeläinen E, Salkinoja-Salonen M, Debevere J. 2006. Influence of type of food on the kinetics and overall production of *Bacillus cereus* emetic toxin. *Journal of Food Protection* **69**:847–852.

- Rajkovic A, Uyttendaele M, Vermeulen A, Andjelkovic M, Fitz-James I, van 't Veld P, Denon Q, Verhe R, Debevere J. 2008. Heat resistance of *Bacillus cereus* emetic toxin, cereulide. *Letters in Applied Microbiology* **46**:536–541.
- Ramarao N, Lereclus D. 2006. Adhesion and cytotoxicity of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* to epithelial cells are FlhA and PlcR dependent, respectively. *Microbes and Infection* **8**:1483–1491.
- Ramarao N, Sanchis V. 2013. The pore-forming haemolysins of *Bacillus cereus*: a review. *Toxins* **5**:1119–1139.
- Ramarao N, Lereclus D, Sorokin A. 2015. The *Bacillus cereus* group. In *Molecular Medical Microbiology*. pp. 1041–1078. Academic Press, USA.
- Rasko DA, Rosovitz MJ, Økstad OA, Fouts DE, Jiang L, Cer RZ, Kolstø AB, Gill SR, Ravel J. 2007. Complete sequence analysis of novel plasmids from emetic and periodontal *Bacillus cereus* isolates reveals a common evolutionary history among the *B. cereus*-group plasmids, including *Bacillus anthracis* pXO1. *Journal of Bacteriology* **189**:52–64.
- Rasko DA, Sperandio V. 2010. Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. *Nature reviews Drug discovery* **9**:117–128.
- Rau J, Perz R, Klittich G, Contzen M. 2009. Cereulide forming presumptive *Bacillus cereus* strains from food—differentiating analyses using cultural methods, LC-MS/MS, PCR, and infrared spectroscopy in consideration of thermotolerant isolates. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* **122**:25–36.
- Raymond B, Johnston PR, Nielsen-LeRoux C, Lereclus D, Crickmore N. 2010. *Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen? *Trends in Microbiology* **18**:189–194.
- Rea MC, Sit CS, Clayton E, O'Connor PM, Whittall RM, Zheng J, Vederas JC, Ross RP, Hill C. 2010. Thuricin CD, a posttranslationally modified bacteriocin with a narrow spectrum of activity against *Clostridium difficile*. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* **107**:9352–9357.
- Reece JB, Taylor MR, Simon EJ, Dickey JL. 2012. DNA profiling. Pages 242–246 in Reece J, Campbell N, Taylor MR, Hogan KA, editors. *Campbell biology: Concepts & connections* (7th Edition). New York.
- Reece JB, Wasserman SA, Urry LA, Cain ML, Minorsky PV, Jackson RB. 2014. *Campbell biology*. Pearson, Boston
- Reimann C, Ginet N, Michel L, Keel C, Michaux P, Krishnapillai V. 2002. Genetically programmed autoinducer destruction reduces virulence gene expression and swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbiology* **148**:923–932.
- Riaz K, Elmerich C, Moreira D, Raffoux A, Dessaux Y, Faure D. 2008. A metagenomic analysis of soil bacteria extends the diversity of quorum-quenching lactonases. *Environmental Microbiology* **10**:560–570.
- Riley MA, Wertz JE. 2002. Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annual Review of Microbiology* **56**:117–137.



- Rouzeau-Szynalski K, Stollewerk K, Messelhaeusser U, Ehling-Schulz M. 2020. Why be serious about emetic *Bacillus cereus*: Cereulide production and industrial challenges. *Food microbiology* **85**:103279.
- Roux E, Yersin A. 1888. Contribution à l'étude diphthérie. *Annales de l'Institut Pasteur* **2**:629.
- Roy V, Adams BL, Bentley WE. 2011. Developing next generation antimicrobials by intercepting AI-2 mediated quorum sensing. *Enzyme and Microbial Technology* **49**:113–123.
- Ryan PA, Macmillan JD, Zilinskas BA. 1997. Molecular cloning and characterization of the genes encoding the L(1) and L(2) components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Journal of Bacteriology* **179**:2551–2556.
- Salehi Jouzani G, Abad AP, Seifinejad A, Marzban R, Kariman K, Maleki B. 2008. Distribution and diversity of dipteran-specific cry and cyt genes in native *Bacillus thuringiensis* strains obtained from different ecosystems of Iran. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **35**:83–94.
- Salveti S, Ghelardi E, Celandroni F, Ceragioli M, Giannessi F, Senesi S. 2007. FlhF, a signal recognition particle-like GTPase, is involved in the regulation of flagellar arrangement, motility behaviour and protein secretion in *Bacillus cereus*. *Microbiology* **153**:2541–2552.
- Sanchis V. 2011. From microbial sprays to insect-resistant transgenic plants: history of the biopesticide *Bacillus thuringiensis*. A review. *Agronomy for Sustainable Development* **31**:217–231.
- Sandiford SK. 2014. Advances in the arsenal of tools available enabling the discovery of novel antibiotics with therapeutic potential. *Expert Opinion on Drug Discovery* **9**:283–297.
- Schoeni JL, Wong AC. 2005. *Bacillus cereus* food poisoning and its toxins. *Journal of Food Protection* **68**:636–648.
- Sebei S, Zendo T, Boudabous A, Nakayama J, Sonomoto K. 2007. Characterization, N-terminal sequencing and classification of cerein MRX1, a novel bacteriocin purified from a newly isolated bacterium: *Bacillus cereus* MRX1. *Journal of Applied Microbiology* **103**:1621–1631.
- Shadrin AM, Shapyrina EV, Siunov AV, Severinov KV, Solonin AS. 2007. *Bacillus cereus* pore-forming toxins hemolysin II and cytotoxin K: Polymorphism and distribution of genes among representatives of the cereus group. *Microbiology* **76**:405–412.
- Shai Y. 2002. Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Biopolymers* **66**:236–248.
- Shannon JG, Ross CL, Koehler TM, Rest RF. 2003. Characterization of anthrolysin O, the *Bacillus anthracis* cholesterol-dependent cytolysin. *Infection and Immunity* **71**:3183–3189.
- Shinagawa K. 1993. Serology and characterization of toxigenic *Bacillus cereus*. *Netherlands Milk and Dairy Journal* **47**:89–103.

- Sinev MA, Budarina ZI, Gavrilenko IV, Tomashevskii AI, Kuzmin NP. 1993. Evidence of the existence of hemolysin II from *Bacillus cereus*: Cloning the genetic determinant of hemolysin II. *Molecular Microbiology* **27**:1218–1229.
- Sineva E, Andreeva-Kovalevskaya ZI, Shadrin AM, Gerasimov YL, Ternovsky VI, Teplova VV, Yurkova TV, Solonin AS. 2009. Expression of *Bacillus cereus* hemolysin II in *Bacillus subtilis* renders the bacteria pathogenic for the crustacean *Daphnia magna*. *FEMS Microbiology Letters* **299**:110–119.
- Skandamis PN, Nychas GJ. 2012. Quorum sensing in the context of food microbiology. *Applied and Environmental Microbiology* **78**:5473–5482.
- Slamti L, Perchat S, Huillet E, Lereclus D. 2014. Quorum sensing in *Bacillus thuringiensis* is required for completion of a full infectious cycle in the insect. *Toxins*, **6**:2239–2255.
- Stenfors Arnesen LP, Fagerlund A, Granum PE. 2008. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS microbiology reviews* **32/4**: 579-606.
- Svensson B, Monthan A, Shaheen R, Andersson MA, Salkinoja-Salonen M, Christiansson A. 2006. Occurrence of emetic toxin producing *Bacillus cereus* in the dairy production chain. *International Dairy Journal* **16**:740–749.
- Swick MC, Koehler TM, Driks A. 2016. Surviving Between Hosts: sporulation and Transmission. *Microbiology Spectrum* 4:4.
- Swiecicka I, Van der Auwera GA, Mahillon J. 2006. Hemolytic and nonhemolytic enterotoxin genes are broadly distributed among *Bacillus thuringiensis* isolated from wild mammals. *Microbial Ecology* **52**:544–551.
- Sylvestre P, Couture-Tosi E, Mock M. 2002. A collagen-like surface glycoprotein is a structural component of the *Bacillus anthracis* exosporium. *Molecular Microbiology* **45**:169–78.
- Szabo RA, Speirs JI, Akhtar M. 1991. Cell culture detection and conditions for production of a *Bacillus cereus* heatstable toxin. *Journal of Food Protection* **54**:272–276.
- Takahashi H, Keim P, Kaufmann AF, Keys C, Smith KL, Taniguchi K, Inouye S, Kurata T. 2004. *Bacillus anthracis* incident. *Emerging Infectious Diseases* **10**:117–120.
- Tayabali AF, Seligy VL. 2000. Human cell exposure assays of *Bacillus thuringiensis* commercial insecticides: production of *Bacillus cereus*-like cytolytic effects from outgrowth of spores. *Environmental Health Perspectives* **108**:919–930.
- Teramura H, Otsubo M, Saito H, Ishii A, Suzuki M, Ogihara H. 2019. Comparative Evaluation of Selective Media for the Detection of *Bacillus cereus*. *Biocontrol Science* **24**: 221-227.
- Thomson JM, Bonomo RA. 2005. The threat of antibiotic resistance in Gram-negative pathogenic bacteria: Betalactams in peril. *Current Opinion in Microbiology* **8**:518–524.
- Thorsen L, Hansen BM, Nielsen KF, Hendriksen NB, Phipps RK, Budde BB. 2006. Characterization of emetic *Bacillus weihenstephanensis*, a new cereulide-producing bacterium. *Applied and Environmental Microbiology* **72**:5118–5121.

- Titball RW. 1999. Membrane-damaging and cytotoxic phospholipases. Pages 310-329 in Alouf JE, Freer JH, editors. *The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins*. Academic Press, London.
- Tokieda K, Morikawa Y, Maeyama K, Mori K, Ikeda K. 1999. Clinical manifestations of *Bacillus cereus* meningitis in newborn infants. *Journal of Paediatrics and Child Health* **35**:582–584.
- Tossi A, Sandri L, Giangaspero A. 2000. Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers* **55**:4–30.
- Tran SL, Guillemet E, Ngo-Camus M, Clybouw C, Puhar A, Moris A, Gohar M, Lereclus D, Ramarao N. 2011. Hemolysin II is a *Bacillus cereus* virulence factor that induces apoptosis of macrophages. *Cellular Microbiology* **13**:92–108.
- Turnbull PC. 2002. Introduction: anthrax history, disease and ecology. *Current topics in microbiology and immunology* **271**:1–19.
- Turnbull PC, Jorgensen K, Kramer JM, Gilbert RJ, Parry JM. 1979. Severe clinical conditions associated with *Bacillus cereus* and the apparent involvement of exotoxins. *Journal of Clinical Pathology* **32**:289–293.
- Ueda A, Wood TK. 2009. Connecting quorum sensing, c-di-GMP, Pel polysaccharide, and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* through tyrosine phosphatase TpbA (PA3885). *PLoS Pathogens* **5**:1000483.
- van Netten P, Kramer JM. 1992. Media for the detection and enumeration of *Bacillus cereus* in foods: a review. *International Journal of Food Microbiology* **17**:85–99.
- Vangoitsenhoven R, Rondas D, Crèvecoeur I, D’Hertog W, Baatsen P, Masini M, Andjelkovic M, Van Loco J, Matthys C, Mathieu C, Overbergh L, Van der Schueren B. 2014. Foodborne cereulide causes beta-cell dysfunction and apoptosis. *PLoS One* **9**:8 e104866.
- Verma V, Raju SC, Kapley A, Kalia VC, Dagainawala HF, Purohit HJ. 2010. Evaluation of genetic and functional diversity of *Stenotrophomonas* isolates from diverse effluent treatment plants. *Bioresource Technology* **101**:7744–7753.
- Vilain S, Luo Y, Hildreth MB, Brözel VS. 2006. Analysis of the life cycle of the soil saprophyte *Bacillus cereus* in liquid soil extract and in soil. *Applied and Environmental Microbiology* **72**:4970–4977.
- Vilas-Bôas GT, Peruca APS, Arantes OMN. 2007. Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, and *Bacillus thuringiensis*. *Canadian journal of microbiology* **53**:673–687.
- Visiello R, Colombo S, Carretto E. 2016. *Bacillus cereus* hemolysins and other virulence factors. Pages 35-44 in *The Diverse Faces of Bacillus cereus*. Academic Press, London.
- Wallace AJ, Stillman TJ, Atkins A, Jamieson SJ, Bullough PA, Green J, Artymiuk PJ. 2000. E. coli hemolysin E (HlyE, ClyA, SheA): X-ray crystal structure of the toxin and observation of membrane pores by electron microscopy. *Cell* **100**:265–276.

- Wang J, Zhang L, Teng K, Sun S, Sun Z, Zhong J. 2014. Cerecidins, novel lantibiotics from *Bacillus cereus* with potent antimicrobial activity. *Applied and Environmental Microbiology* **80**:2633–2643.
- Wang S, Zheng Y, Gu C, He C, Yang M, Zhang X, Guo J, Zhao H, Niu D. 2017. *Bacillus cereus* AR156 activates defense responses to *Pseudomonas syringae* pv. tomato in *Arabidopsis thaliana* similarly to flg22. *Molecular plant-microbe interactions* **31**:311–322.
- Welkos SL, Friedlander AM. 1988. Comparative safety and efficacy against *Bacillus anthracis* of protective antigen and live vaccines in mice. *Microbial Pathogenesis* **5**:127–39.
- Wijnands LM, Dufrenne JB, Rombouts FM, In't Veld PH, Van Leusden FM. 2006. Prevalence of potentially pathogenic *Bacillus cereus* in food commodities in the Netherlands. *Journal of food protection* **69**:2587-2594.
- Wijman JG, de Leeuw PP, Moezelaar R, Zwietering MH, Abee T. 2007. Air-liquid interface biofilms of *Bacillus cereus*: formation, sporulation, and dispersion. *Applied and Environmental Microbiology* **73**:1481–1488.
- Willey JM, van der Donk WA. 2007. Lantibiotics: peptides of diverse structure and function. *Annual Review Microbiology* **61**:477–501.
- Williams LD, Burdock GA, Jiménez G, Castillo M. 2009. Literature review on the safety of Toyocerin®, a non-toxigenic and non-pathogenic *Bacillus cereus* var *toyoi* preparation. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **55**:236–246.
- Xin B, Zheng J, Xu Z, Li C, Ruan L, Peng D, Sun M. 2015a. Three novel lantibiotics, ticins A1, A3, and A4, have extremely stable properties and are promising food biopreservatives. *Applied Environmental Microbiology* **81**:6964–6972.
- Xin B, Zheng J, Xu Z, Song X, Ruan L, Peng D, Sun M. 2015b. The *Bacillus cereus* group is an excellent reservoir of novel lanthipeptides. *Applied Environmental Microbiology* **81**:1765–1774.
- Xin B, Zheng J, Liu H, Li J, Ruan L, Peng D, Sun M. 2016. Thusin, a novel two-component lantibiotic with potent antimicrobial activity against several Gram-positive pathogens. *Frontiers in microbiology* **7**:1115.
- Yang IC, Shih DYC, Huang TP, Huang YP, Wang JY, Pan TM. 2005. Establishment of a novel multiplex PCR assay and detection of toxigenic strains of the species in the *Bacillus cereus* group. *Journal of Food Protection* **68**:2123–2130.
- Yokoyama K, Ito M, Agata N, Isobe M, Shibayama K, Horii T. 1999. Pathological effect of synthetic cereulide, an emetic toxin of *Bacillus cereus*, is reversible in mice. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* **24**:115–120.
- Yuan YM, Hu XM, Liu HZ, Hansen BM, Yan JP, Yuan ZM. 2007. Kinetics of plasmid transfer among *Bacillus cereus* group strains within lepidopteran larvae. *Archives of Microbiology* **187**:425–431.
- Zasloff M. 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* **415**:389–395.

## Seznam použitých zkratk a symbolů

- AHL – Acyl-homoserinové laktony  
AIP – Autoindukční peptidy  
Alo – Anthrolyzin O  
AMP – Antimikrobiální peptidy  
ATCC – Americká sbírka typových kultur  
BceT – Enterotoxin T  
BLIS – z anglického bacteriocin-like inhibitory substances – inhibiční látky podobné bakteriocinům  
BMK – Bakterie Mléčného Kvašení  
CCM – Česká sbírka mikroorganismů  
CDC – Cholesterol-dependentní cytolyziny  
CerAB – Cereolyzin AB  
Clo – Cereolyzin O  
CytK – Cytotoxin K  
DNA – Deoxyribonukleová kyselina  
DSMZ – Německá sbírka pro mikroorganismy a buněčné kultury  
EFSA – z anglického European Food and Safety Authority – Evropský úřad pro bezpečnost potravin  
Ent FM – Enterotoxin FM  
Hbl – Hemolyzin BL  
Hly – Hemolyziny  
HlyII – Hemolyzin II  
Hly III – Hemolyzin III  
InhA1 – Imunne inhibitor A  
LD<sub>50</sub> – Letal Dose – dávka toxické látky, která způsobí úhyn 50 % testovaných živočichů do 24 h od expozice  
MALDI-TOF – Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time Of Flight: Hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací v kombinaci s detektorem doby letu  
MYP – Mannitol Yolk Polymyxine  
Nhe – Nehemolytický enterotoxin  
NK buňky – z anglického Natural Killer cells  
PCR – z anglického Polymerase Chain Reaction – Polymerázová řetězová reakce  
PC-PLC – Fosfatidylcholin preferující lecitináza  
PEMBA – Polymyxin Egg yolk Mannitol Bromothymol blue Agar  
Pfo – Perfringolyzinem O  
PI-PLC – Fosfatidylinositol specifická lecitináza  
QS – Quorum sensing  
QQ – Quorum quenching  
QSI – Quorum sensing inhibitor  
Tlo – Thuringiolyzin O  
UV – Ultrafialové záření



