



# Bacillus spp

Epp Songisepp  
BioCC OÜ vanemteadur

17.05.2019

## Aeroobsed eoseid moodustavad bakterid

Firmikuudid perekondadest *Sporosarcina*, *Paenisporosarcina*, *Brevibacillus*, *Paenibacillus*, *Geobacillus* ja *Bacillus*

Tootmise hügieenilist taset iseloomustav mikrobioota

Suudavad ellu jääda pastöriseerimisel → pastöriseerimise-järgne saasteallikas.

**Biokile** moodustajad villimisliinil, pakenditel, torudes ja roostevabast terasest pindadel, eriti nn pimedates nurkades, pragudes, tihendites, ventiilides

*NB! Pastöriseerimise-järgseks saasteallikaks on tööstuse-omased tüved.*

*Liigiline mitmekesisus suurem kui toorainest tuleneval saastusel*

### *Bacillus spp*

Gram-positiivsed aeroobsed /fakultatiivselt anaeroobsed, katalaas-positiivsed, endospore moodustavad pulkbakterid

Looduses laialt levinud. Pinnas - reservuaar

Võimelised kasvama väga laias temperatuurivahemikus: 1°C....70°C

Biokeemiliselt aktiivsed, lai spekter ensüüme – proteinaasid, lipaasid, amülaasid fosfolipaasid,

### *Bacillus spp*

Puu-ja juurviljad /- mahlad jm, maitseained, pähklid, lihasaadused, piimatooted,

Toorpiimas domineerivad mesofiilsed psühro- ja termotolerantsed liigid: *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus* ja *Bacillus subtilis*

Spooride arvukus nt toorpiimas sõltub hooajalistest muutustest

## *Bacillus spp*

**NB!** *Bacillus spp* omab EL-s EFSA QPS staatust

EFSA Journal 2017;15(3):4664

*Bacillus clausii*

*Bacillus atrophaeus*

*Bacillus pumilus*

*Bacillus coagulans*

*Bacillus subtilis*

*Bacillus fusiformis*

*Bacillus licheniformis*

*Bacillus mojavensis*

*Bacillus flexus*

*Bacillus smithii*

*Bacillus megaterium*

*Bacillus vallismortis*

*Bacillus amyloliquefacien*

v.a *Bacillus cereus* grupp

## *Bacillus cereus*

Piima – ja piimatoodete kvaliteedi mõjutaja

Maitse- ja lõhnavead, proteolüüs

nt koore kalgendumine

On leitud jäätisest, joogipiimast, piimapulbrist

Leiva venimine (amülaasid → EPS )

>50 °C ei kasva, aga

termoresistentne: spoorid jäävad ellu pastöriseerimisel

Psührofiilsed tüved kasvavad külmkapitemperatuuril

## *Bacillus cereus*

### Oportunistlik patogeen

Piisav doos:  $10^3$  PMÜ

Toodab kahte toksiini:

- termostabiilne (tulemuseks nn emeetiline sündroom -oksendamisega toidumürgistus),  
Nakatutakse valdavalt seotud riisiga
- Termolabiilsed toksiinid (vähemalt kolm erinevat) (tulemuseks kõhulahtisus ).  
Nakatutakse: lai spekter toiduaineid (sh liha ja taimsed)

### **EVS-EN ISO 7932**

#### MYP agar (Mannitol Egg Yolk Polymyxin Agar)

Eeldatavad *B. cereuse* kolooniad on suured, roosad (mannitooli ei ole fermenteeritud) karvase äärega ja sageli ümbritsetud sadestustsooniga (letsitinaasi produtseerimise tagajärg).

## *Bacillus cereus* grupp

*B. cereus*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*,  
*B. thuringiensis*, *B. weihenstephanensis*, *B. toyonensis*,  
*B. anthracis*

standardmeetoditega eristamatud

*Bacillus thuringiensis* – insektitsiidina kasutusel,  
ülekanne toorainega tööstusesse

*Bacillus* spp

Teised liigid valdavalt seotud toidu riknemisega  
Kuid....

Ka teised *Bacillus* spp liigid suudavad toota toksiine:

- termostabiilseid toksiine

*B. circulans*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*,  
*B. lentus*, *B. subtilis*, *B. pumilus*,

- termolabiilseid toksiine

*B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*,  
*B. mojavensis*, *B. simplex*, *B. firmus*, *B. circulans*, *B. lentus*,  
*B. megaterium*

Seega mitmed *Bacillus* spp liigid samuti potentsiaalsed  
patogeenid

***B. subtilis*** pole inimpatogeeniks kuulutatud,  
kuid seotud toidumürgistuse puhangutega  
(leib, kala, linnuliha)

***B. pumilus*** - isoleeritud mastiidihaigetelt lehmadel,  
inimpatogeeniks kuulutatud pole.

Mürgistuse sümptomid :

peapööritus, peavalu, külmavärinad, kõhukrambid,  
kõhulahtisus.

Nahanähud sarnanevad antraksile

***B. amyloliquefaciens*** - Tugev biokile moodustaja,  
leidub taimel materjalil (maitseained, leitud ka suhkrust)  
Leiva venimine (amülaasid → EPS )  
Majoneeside, salatikastmete riknemine gaasi intensiivse  
moodustumisega

***B coagulans*** tüvesid kasutusel probiootikumina  
sh vana nimetuse all *Lactobacillus sporogenes*  
Geneetiliselt heterogeenne  
Termotolerantne, temperatuurioptimum 35 - 50°C ,  
kasvavad ka 60–65°C ja happelises keskkonnas (pH 4.6)  
leidub fakultatiivselt anaeroobseid tüvesid.  
Piimatoodete, mahlade jm taimset päritolu toidutoodete  
riknemine

Toodete säilitamine võimalikult madalal  
temperatuuril (  $\leq 5^{\circ}\text{C}$ ) aitab pidurdada maitse- ja  
tekstuurivigade tekkimist termoresistentsete liikide  
puhul, mis pole psührotroofid

Psührotroofid: liigi- ja tüvespetsiifilisus  
Mikroobi generatsiooniaeg pikeneb madalatel  
temperatuuridel.

*Generatsiooniaeg: ajavahemik, mis kulub  
mikroobipopulatsioonis rakkude arvu  
kahekordistumiseks.*

TABLE 1. *Growth parameters for Bacillus spp. grown in milk.*

Species	Temperature of growth					
	2°C		6°C		10°C	
	Lag <sup>a</sup>	Gen <sup>b</sup>	Lag	Gen	Lag	Gen
<i>B. cereus</i> <sup>c</sup>	NG <sup>d</sup>	NG	78	17	24	4
<i>B. circulans</i> <sup>e</sup>	60	28	33	11	31	7
<i>B. mycooides</i> <sup>f</sup>	NG	NG	92	22	33	4

<sup>a</sup> Lag time in h.

<sup>b</sup> Generation time in h.

<sup>c</sup> Mean for four strains.

<sup>d</sup> NG=No growth after 21 d incubation.

Meer *et al.*, 1991

Pühhotroopsete vegetatiivsed rakud termotöötluksle ja traditsioonilistele desoainetele tundlikud

Toote rasvasisaldus kaitseb spoore.

*Bacillus* spp D-väärtus 95°C juures lõssis 25 sek vs 36 sek kooses (48 rasva%)

Piimatoote pikk säilivusaeg külmkapi temperatuuril  
→ UHT töötlus + aseptiline villimine

Riknemise põhjus:

- termoresistentsed spoorid,
- harvem aseptilise villimise ebaõnnetsumine

*D* väärtus: decimal reduction time

Toorpiima pikem jahutatult säilitamine enne töötlust, kõrgemad pastöriseerimistemperatuurid ja pikem säilitusaeg tõstavad termotolerantsete psührotroofsete mikroorganismide olulisust piimatoodete riknemisel.

Termotolerantsed psührotroofid

(unikaalne kombinatsioon!)

perekondadest *Clostridium*, *Arthrobacter*,  
*Microbacterium*, *Streptococcus*, *Corynebacterium*,  
*Bacillus*.

**Domineerivad: *Bacillus* spp.**

***B. licheniformis*** - *B. cereuse* kõrval toorpiimas ja tööstuses enim levinud.

Fakultatiivne anaeroob.

Levinud piimapulbrites, laste jätkupiimasegudes

Võimeline tooma termostabiilseid toksiine,

Seotud toidumürgistustega, lastel

Geneetiliselt heterogeenne liik

Tekivad konkreetsele tööstusele omased tüved



***B. sporothermodurans*** –

psührotolerantne mesofiil,

väga termoresistentsete spooridega.

Taluvad hästi UHT töötlust ( 130 °C for 4s),

D 140, 3.4–7.9s

Toorpiimas ei domineeri.

Saasteteed pole lõpuni välja selgitatud. Loomasööt?

Valdavalt leitud UHT piimast ja UHT piima pulbrist

valmistatud toodetest (šokolaad, koor, pulber)

## Spooride termoresistentsus

- liigispetsiifiline
- mikroobi optimaalsest kasvutemperatuurist sporulatsiooni ajal ( 10x ↑ 30°C...44°C juures)
- spoori rakukesta keemilisest koostisest (nt DPA vähendab spoori kesta vee sisaldust, → termoresistentsuse tõus)
- Spoori-spetsiifilised valgud spoVA - soodustavad DPA viimist sporuleeruvasse rakku

**DPA** (*dipikoliinhape, püridiin-2,6-dikarboksüülhape*) enamasti ≥ 10% spoori KA.

DPA moodustab gelaate kahevalentsete katioonidega (nt  $\text{Ca}^{2+}$ )

## *Bacillus spp* spooride idanemine:

Päritolu tõenäoliselt mõjutab *Bacillus spp* spooride idanemise kiirust:

- mullast pärinevad (metsikud) tüved kiiremad idanejad,
- toorpiimast ja seadmetelt - aeglasemad
- Tööstuse-omased nõ "maskott-tüved" (pastöriseerimise-järgne kontaminant) aeglasemad idanejad

Mikroobi tüve / liigi omadused sh

Spooride moodustumisel esinenud tingimused

Germinosoom:

idanemist soodustavate retseptorite kogum

Spooride idanemist soodustavad toitainelised ja mitte-toitainelised tegurid

### Toitainelised tegurid:

- aminohapped, soolad, suhkur, mitme kombinatsioon  
Nt piimajääkidega biokile tööstuses – ideaalne keskkond idanemiseks

- Toitainete kinnitumine spoori nn idanemis-retseptoritele

→ CaDPA (dipikoliinhappe – Ca) kompleksi vabanemine spoori kestast minutitega (spoVA valgud)

Nt Piimas leitud germinatsioonipromootorid (*peptiidid MW <200;  $\alpha$ -aminohapped (nt valiin, apsparagiin), soomaatilised rakud*)

### mitte-toitainelised tegurid:

- Vee olemasolu keskkonnas →  
mikroobirakkude rehüdreerumine
- Spoori väline Ca-DPA ,
- vegetatiivse mikroobiraku peptiidoglükaan keskkonnas
- Antimikroobsed ühendid: lüsoosüüm, dodetsüülamiin,
- Füüsikaline stress nt rõhk, kuumus

### Stressivastus

Bakterid on kiired kohanejad

Korduv stress suurendab bakteri vastupidavust järgnevale samale stressile

- aitab paremini taluda erinevaid stresse (nt füüsiline ja keemiline stress)

→ Mikroobiraku ja ka spoori ainevahetuse ümberkõlastamine

- Kuumašokk vabastab ka Ca-DPA kompleksi ja käivitab idanemise.

→rakukesta muutused / lüüs, geenide ja ensüümide aktivatsioon, mikroobiraku metaboolne aktiveerumine

Nt mikroobile optimaalne subletaalne kuumtöötlus (nt 80°C , 10 min) vähendab toitainete vajadust spooride idanemiseks

Mahajahutamine pidurdab alanud germinatsiooni

- Spoores aktiveerib ka madalatel temperatuuridel inkubeerimine

- Madalate rõhkude (300 MPa) toime sarnane toitainete poolt indutseeritud idanemisega, germinatsiooniretseptorid aktiveeruvad

- Kõrgematel rõhkudel 500 kuni 800 Mpa retseptorid ei ole kaastatud.  
Ca-DPA vabaneb. Spoorid UV ja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> resistentsed

**Dodetsüülamiin,**

Pika-ahelalised alküülamiinid toimivad idanemist soodustavatena kuni 70°C

>70°C : spoori kesta lagundavad lüütilised ensüümid ei käivitu. Metabolism ei käivitu.

**Lüesosüüm** soodutab CaDPA vabanemist, kuid väljakasvanud mikroobikrakud on enamasti L-vormid ebatsabiilsed

Paraku: L-vormide puhul rakkude –vaheline infovahetus kergem.

→ AB resistentsuse, mutatsioonide paremad levikuvõimalused.

Toorpiimas eoseid moodustavatest aeroobidest lahti ei saa.

Oluline hoida psührotroofsete kuumakindlate bakterite arvu toorpiimas võimalikult madalal: terve loom, hügieen, kiire jahutamine, loomasööt

Tööstuses: hügieen, personal.

*Alternatiivsete biotsiidide (ensüümipõhised desoained, baktriofaagid...) kasutamine biokile ohjamiseks*

kooskõlas (EL) 528/2012

**TÄNAN TÄHELEPANU EEST!**