

REZUMAT

Teza intitulată: „**CARACTERIZAREA BACTERIOLOGICĂ ȘI PATOGENICĂ A UNOR TULPINI DE *BACILLUS CEREUS* IZOLATE DIN ALIMENTE**” este motivată științific și practic de următoarele aspecte:

- prevalența ridicată în alimente a bacteriilor din specia *B. cereus*;
- relativa sărăcie a literaturii autohtone privind particularitățile bacteriologice și de patogenitate a bacteriilor din specia *Bacillus cereus*;
- necesitatea cunoașterii microorganismelor care pot contamina alimentele și a proprietăților acestora, cunoștințe care pot fi utilizate în procesul complex de evaluare a riscului asociat prezenței acestor microorganisme în alimente. Cunoașterea acestor caracteristici este importantă nu numai din punctul de vedere al evaluării efectului negativ pe care îl pot exercita direct sau indirect aceste microorganisme, ci și pentru a se pune la punct măsuri adecvate, argumentate științific, necesare pentru a se stăpâni eficient aceste pericole de natură microbiologică.

Teza are 229 pagini și este structurată, în conformitate cu prevederile legale actuale, în două părți principale. Prima parte, intitulată „**Stadiul actual al cunoașterii**”, cuprinde 56 pagini și reprezintă 24,5% din teză iar partea a doua, „**Contribuții personale**”, acoperă 173 de pagini reprezentând 75,5 % din teză. Lucrarea este acompaniată de 31 tabele, 33 grafice și 33 fotografii pentru o mai bună prezentare a conținutului. Bibliografia consultată cuprinde 425 de titluri din literatura de specialitate autohtonă și străină.

Prima parte este alcătuită din patru capitole în care sunt prezentate succint, informații din literatura de specialitate referitoare la subiectul tezei, date care au fost folosite pentru interpretarea și compararea rezultatelor obținute în partea a doua.

În primul capitol sunt prezentate date privind taxonomia speciei *Bacillus cereus*, la nivelul anului 2005, accentuându-se o serie de particularități importante din punct de vedere epidemiologic, generate de marea heterogenitate a genului *Bacillus*.

Capitolul al II-lea, intitulat: „**Particularitățile bacteriilor din specia *Bacillus cereus***” prezintă, pe baza literaturii consultate, caracterele morfologice, fiziologice, metabolice și de patogenitate a bacteriilor din această specie, privite în strânsă legătură cu obiectivele tezei de doctorat. Se cunosc, la ora actuală, mai multe enterotoxine și o toxină cu efect vomitiv cu implicații certe în producerea toxiinfecțiilor alimentare, la care se adaugă alți factori de patogenitate cu rol în infecțiile cu alte localizări decât cea gastro-intestinală. De asemenea, tot în acest capitol, sunt prezentate date referitoare la influența unor factori fizico-chimici și a unor substanțe antibiotice și decontaminante asupra formelor vegetative și sporulate ale bacteriei.

Epidemiologia infecțiilor produse de *Bacillus cereus* este prezentată sintetic în capitolul al III – lea. Echipamentul enzimatic complex, exigențele metabolice reduse și prezența formei sporulate contribuie la larga răspândire în mediu a bacteriei. Habitatul natural al bacteriei este solul, de unde sporii pot ajunge pe diverse substraturi, pe care le contaminează. Purtătorii de germeni, deși există, nu prezintă o importanță epidemiologică majoră. Receptivitatea gazdelor, citată în literatura de specialitate, nu a fost dovedită fără echivoc, până în prezent, în cazul toxiinfecțiilor alimentare.

Toxiinfecțiile alimentare fiind afecțiunile cele mai frecvente produse de *Bacillus cereus*, alimentele reprezintă o sursă importantă de contaminare a omului, iar dintre acestea alimentele pe bază de orez și cele intens condimentate sunt cel mai des incriminate. Prevalența bacteriei în alimente este, în general, mare dar nivelul de contaminare este redus.

În capitolul al IV – lea „***Implicațiile speciei Bacillus cereus în patologie***”, sunt descrise, pe baza literaturii consultate, principalele afecțiuni produse de această bacterie la om și animale. *Bacillus cereus* produce două tipuri de toxiinfecții alimentare la om: forma diareagenă și forma vomitivă, denumite astfel pe baza manifestărilor clinice predominante. Frecvența cu care apar cele două forme de toxiinfecție diferă de la o regiune geografică la alta, fiind consecința, în principal, a obiceiurilor culinare. În afara toxiinfecțiilor alimentare *Bacillus cereus* produce la om numeroase infecții localizate sau generalizate; în acest caz, sursele de infecție fiind foarte diversificate iar receptivitatea gazdei joacă un rol important.

La animale infecțiile cu *Bacillus cereus* sunt rare, mai importante fiind mamita și avortul.

Partea a II – a, „***Contribuții personale***”, cuprinde: trei capitole, concluziile generale și bibliografia, în care sunt prezentate și discutate rezultatele investigațiilor efectuate.

În capitolul V, „***Izolarea, identificarea și prevalența bacteriei Bacillus cereus în alimente***” sunt prezentate rezultatele investigațiilor efectuate pe parcursul anilor 2000-2003 cu scopul de a se izola un număr cât mai mare de tulpini de *Bacillus cereus* cu origine alimentară pentru a fi creat un stoc de tulpini necesar pentru investigațiile ulterioare. Concomitent, s-a stabilit prevalența bacteriei în alimentele examinate, în funcție de aliment și gradul de contaminare cu *Bacillus cereus*.

Izolarea și confirmarea s-a efectuat în conformitate cu SR ISO 7932/1997, pe baza caracterelor morfologice, culturale și metabolice. În plus pentru 43 de tulpini selectate pentru a fi caracterizate ulterior s-a efectuat identificarea cu ajutorul galeriilor API 50CHB și API 20E stabilindu-se concomitent și profilul metabolic al acestor tulpini.

Din cele 123 tulpini prezumtive izolate pe mediul MYP, 102 (82,92%) au fost confirmate ca fiind *B. cereus*, fapt care atestă selectivitatea bună a mediului MYP. Din tulpinile confirmate prin metoda SR ISO 7932/1997 și testate suplimentar prin teste API, doar trei nu au putut fi identificate corespunzător. În cazul acestor două tulpini sistemul nu a exclus posibilitatea de a fi *B. cereus*, dar probabilitatea mică a condus la profiluri inacceptabile sau imposibil de diferențiat.

B. cereus a fost izolat din toate tipurile de alimente examinate, dovedind larga răspândire bacteriei în alimente. Prevalența bacteriei în probele examinate a fost ridicată dar mică, în comparație cu valorile comunicate de alți autori. În studiul efectuat prevalența cea mai mare s-a evidențiat în cazul probelor de condimente (31,03%) iar cea mai mică la probele de preparate din carne în membrană - proaspături. Deși prevalența este ridicată, gradul de contaminare a probelor este redus. Gradul de contaminare evidențiat în acest studiu, a fost cuprins între mai puțin de 10 UFC/g sau ml și $7,9 \times 10^3$ UFC/g sau ml produs, depășind rareori limita impusă de reglementările actuale (la produsele la care există) și niciodată nivelul considerat de literatura de specialitate periculos, în mod cert, pentru consumator. Gradul de contaminare cel mai ridicat s-a constatat la probele din condimente.

În capitolul al VI – lea, pe parcursul a 7 subcapitole, s-au evaluat caracteristicile metabolice, fiziologice și rezistența la antibiotice la 40 de tulpini de *Bacillus cereus* izolate și confirmate anterior. Pentru a se evidenția unele diferențe legate de originea tulpinilor și de toxigenitatea

acestora, tulpinile caracterizate au fost grupate în trei categorii în funcție de origine și în două categorii în funcție de patogenitate.

Testarea caracterelor biochimice la cele 40 de tulpini de *B. cereus* prin testele API, a evidențiat un metabolism complex, tradus prin metabolizarea, în procente diferite, a 23 de carbohidrați din cei 49 testați și în procent de 100% a gelatinei. Au fost constatate variații ale metabolismului glucidic, în funcție de originea tulpinilor și de toxigenitatea acestora dar nu s-a reușit stabilirea unor corelații semnificative. Totuși, s-a remarcat comportamentul relativ asemănător al tulpinilor izolate din lapte și produse lactate.

Temperatura este un factor important, care afectează procesele vitale ale microorganismelor, prin controlul căreia comportamentul acestora se poate stăpâni și modela. În subcapitolele 6.2-6.4 sunt prezentate rezultatele investigațiilor prin care s-a urmărit efectul temperaturii asupra creșterii formelor vegetative, a germinării sporilor și a sporulării formelor vegetative. Au fost alese ca limite temperaturi care se ating frecvent de-a lungul traseului pe care îl parcurg alimentele de la stadiul de materie primă până la momentul consumului. Pentru evaluarea efectului temperaturii au fost calculate rata de creștere, rata de sporulare și respectiv rata de germinare iar valorile obținute au fost interpretate statistic.

Tulpinile care au avut abilitatea de a crește la temperaturi scăzute (7°C) au fost evidențiate cu o frecvență mai mare în lapte și produse din lapte, în timp ce tulpinile izolate din carne și produse din carne s-au dezvoltat mai bine la temperaturi medii și ridicate, ceea ce denotă posibilitatea unei selecții a acestor tulpini pe parcursul procesului tehnologic de prelucrare și depozitare a produselor alimentare.

Au fost constatate diferențe de germinare a sporilor în funcție de temperatură, de originea tulpinilor și de toxigenitatea acestora,

concretizate prin valori diferite ale ratei de germinare și ale procentului de germinare. Sporii tulpinilor izolate din lapte și produse lactate au avut rata de germinare cea mai mare la 20°C în timp ce tulpinile din carne și produse din carne au avut rata de germinare cea mai mare la 30°C. Sporii tulpinilor izolate din „alte alimente” au manifestat cea mai mare variabilitate a valorilor ratei de germinare și a procentului de germinare.

La temperatura de 7°C, pe mediul lichid, sporularea nu s-a produs la niciuna din tulpinile testate, ceea ce înseamnă că în alimentele ținute la temperatura de refrigerare bacteria nu sporulează. Rata de sporulare a crescut odată cu creșterea temperaturii valorile cele mai mari fiind obținute la 37°C. Nu au fost evidențiate diferențe notabile ale valorilor medii ale ratei de sporulare în funcție de originea sau de toxigenitatea tulpinilor.

În subcapitolul 6.5 sunt prezentate rezultatele obținute în urma testării termorezistenței sporilor tulpinilor de *B. cereus*. Termorezistența sporilor a fost testată la 90°C și s-au calculat pentru fiecare tulpină timpul de reducere zecimală (D_{90}) și timpul până la prima reducere zecimală (d). Valorile obținute au confirmat termorezistența relativ redusă a sporilor de *Bacillus cereus* dar și diversitatea răspunsului în cadrul speciei, timpul de reducere zecimală la 90°C, la tulpinile testate, având valori cuprinse între 23,11 și 81,89 minute. Valorile parametrilor care descriu comportamentul sporilor la tratamentul termic nu au fost afectate în mod determinant de originea tulpinilor, majoritatea tulpinilor analizate fiind tulpini de contaminare cu origine asemănătoare, care nu au suferit expuneri repetate la tratamente termice specifice produselor examinate și prin urmare nici procese de adaptare descrise în literatură de unii autori.

Compararea statistică a valorilor parametrilor care caracterizează din punct de vedere fiziologic tulpinile de *Bacillus cereus* examinate, realizată în subcapitolul 6.6, nu a furnizat rezultate care să

permite stabilirea unor corelații stabile și evidente între variațiile acestor parametri, fapt care confirmă, odată în plus, biodiversitatea existentă în cadrul speciei și face ca evaluarea riscului reprezentat de prezența acestui microorganism în alimente să fie o operațiune foarte dificilă.

În subcapitolul 6.7 a fost testată acțiunea unor antibiotice (31) asupra tulpinilor de *Bacillus cereus*, atât prin metoda clasică (13) cât și cu ajutorul testului API ATB-Vet (28). Tulpinile de *Bacillus cereus* testate au fost rezistente la nouă din cele 31 de substanțe antibiotice testate, majoritatea acestora făcând parte din grupa antibioticelor cu nucleu beta-lactamic; 14 din substanțele antibiotice testate au fost active față de toate tulpinile de *Bacillus cereus* testate, acestea fiind, în principal, aminoglicozide, macrolide, tetracicline și quinolone, în timp ce un număr de 8 antibiotice au avut un efect inconstant asupra tulpinilor examinate.

Rezultatele obținute în acest studiu sunt asemănătoare cu cele publicate de alți autori care au efectuat cercetări în acest sens și confirmă antibiorezistența relativ mare a bacteriilor din specia *Bacillus cereus*, fapt ce contribuie la gravitatea infecțiilor pe care acesta le produce la om și animale.

În capitolul VII sunt prezentate rezultatele investigațiilor privind patogenitatea tulpinilor de *Bacillus cereus*. Patogenitatea tulpinilor a fost evaluată prin teste in vivo efectuate pe șoarece și pe iepure. Din cele 40 de tulpini de *Bacillus cereus* testate în vederea stabilirii toxigenității un număr de 13 tulpini (32,5%) au furnizat rezultate pozitive la unul sau mai multe din testele efectuate.

Testul ansei intestinale ligaturate a fost pozitiv la 12 din cele 40 de tulpini testate (30%) fiind mai puțin sensibil decât testul permeabilității vasculare, efectuat tot pe iepure, care a fost pozitiv la 13 tulpini din cele 40 de tulpini testate. Dintre testele efectuate pe șoarece, pentru confirmarea rezultatelor obținute la testele efectuate pe iepure, inocularea intraperitoneală a filtratului bacterian a fost mai puțin eficientă, în

comparație cu administrarea intravenoasă sau intranazală. Tulpinile toxigene au fost relativ uniform distribuite în cele trei categorii de alimente examinate. Totuși, cele mai multe tulpini toxigene au fost identificate în lapte și produse lactate (40%) comparativ cu tulpinile din carne și produse din carne (26,6%) și cele din „alte alimente” (30%). Dintre testele aplicate se distinge prin rapiditate, simplitate și acuratețe testul inoculării intranazale a culturilor bacteriene la șoarece, fapt remarcat și de alți autori.

În condițiile dificultăților actuale de aplicare a unor teste de diagnostic performante, testele „in vivo” aplicate în acest studiu, cu toate că nu oferă informații referitoare la tipul enterotoxinei responsabile de efectul toxigen, reprezintă un instrument util pentru depistarea tulpinilor toxigene de *Bacillus cereus*, atunci când sunt aplicate corect.

Analiza celor 40 de tulpini de *Bacillus cereus* ne permite, prin prisma rezultatelor obținute, să afirmăm că există o mare variabilitate a răspunsului bacteriilor din specia *Bacillus cereus* la acțiunea factorilor testați în acest studiu. Din punctul de vedere al siguranței alimentare acest fapt are consecințe majore întrucât datorită acestui comportament diferit în condiții similare este dificil, dacă nu chiar imposibil, să se implementeze măsuri care să fie eficiente pentru toate tulpinile de *Bacillus cereus*. Totuși, așa cum arată datele obținute în acest studiu, se poate reduce până la limite acceptabile riscul reprezentat de *Bacillus cereus* pentru consumator dacă se combină măsurile de reducere a prevalenței bacteriei în alimente cu păstrarea acestora la temperaturi mai mici de 4°C, sau cel mult 7°C, un timp variabil, mai scurt în cazul alimentelor expuse mai frecvent contaminării.

ABSTRACT

The thesis entitled “**BACTERIOLOGIC AND PATHOGENIC CHARACTERIZATION OF SOME FOOD ISOLATED *BACILLUS CEREUS* STRAINS**” is scientifically and practically motivated by the following aspects:

- the prevalence of *Bacillus cereus* in foods is usually high;
- relative lack of data concerning the bacteriologic and pathogenic particularities of food isolated *Bacillus cereus* strains in native literature;
- the need of knowledge about microorganisms that could contaminate foods and their characteristics, information that could be used in complex process of risk assessment related to presence of microorganisms in food. The knowledge of these characteristics is important not only for the evaluation of direct or indirect negative impact on food safety but for implementing of adequate scientific argued measures in order to efficiently manage these microbiological hazards.

The thesis contained 229 pages and is structured, in accordance with legal stipulation, in two main parts: first part, entitled “***Actual stage of knowledge***” includes 56 pages which represent 24.5 (%) of thesis and the second part “***Personal contribution***” covering 173 pages which represent 75.5 % of thesis. The thesis contain 31 tables, 33 charts and 33 photos which illustrate the results and simplify the understanding of text.

First part cover four chapters in which are presented briefly and concise information from scientific literature focused on the topic of the

thesis; these data were used in interpretation and comparison of the results obtained in second part of the thesis.

In the first chapter are presented data regards the taxonomy of *Bacillus cereus* species up to 2005, emphasizing some particularities important from the epidemiological point of view as a consequences of huge heterogeneity within *Bacillus* genus.

The second chapter entitled: “*Particularities of Bacillus cereus species*” present on the basis of studied literature the morphologic, physiologic, metabolic and pathogenic characteristics of *Bacillus cereus* microorganisms in connection with the thesis objectives. At the moment, three enterotoxins (Hemolysin BL, Non haemolytic enterotoxin and Cyt K) and the emetic toxin (cereulid) are recognized as determining factors of *Bacillus cereus* food poisoning, whereat other pathogenic factors involved in nongastrointestinal local or systemic infections affix to in order to complete the pathogenic picture of the species. In the same chapter there are presented data concerning the influence of some specific physical and chemical factors, antibiotics and disinfectant substances on *Bacillus cereus* vegetative cells and spores.

Data concerning the epidemiology of *Bacillus cereus* infections are succinctly presented in chapter III. The abundance and complexity of enzymatic equipment, the weak metabolic necessities and the ability to form spores are the main factors that contribute to environmental wide spreading of *Bacillus cereus*. The common ecological niche of *Bacillus cereus* is soil, from where the spores are spreading with dust particles on different surfaces that become contaminated. *Bacillus cereus* carriers, although they exist, their epidemiological importance is minimal.

Host receptivity in *Bacillus cereus* food poisoning, even if cited in specialty literature, hasn't been scientifically proven yet.

Food poisoning being the most frequent health problem caused by *Bacillus cereus*, food are regarding as the major source of human contamination. Rice based foods, pasta and intense spiced assortments of food are frequently on food poisoning origin. Prevalence of bacteria in milk and milk products is quite big but this category of foods are rarely associated with *Bacillus cereus* food poisoning.

In chapter four - “*Implication of Bacillus cereus species in pathology*” are presented, based on the available references, the main *Bacillus cereus* infections in humans and animals. *Bacillus cereus* is responsible for two types of food poisoning in human: the diarrhoeal type and the emetic type, named on the basis of predominant symptoms. The frequency of these two types of foodborne disease depends on geographical region being influenced mainly by the culinary habits of the people. *Bacillus cereus* was reported as a causative agent of numerous nongastrointestinal, local or systemic infections. In these cases the contamination sources are more various and the host receptivity is more important than in case of foodborne disease. In animals *Bacillus cereus* infections are rare, mastitis and abortion being the most known and described in literature.

The second part – “Personal contribution” cover three main chapters with ten subchapters, general conclusions and the references. In this part are presented and discussed the results of performed investigations.

In chapter V – “Isolation, identification and prevalence of *Bacillus cereus*”, are presented the results of investigations performed during the 2000-2003 period in order to isolate from food the strains of *Bacillus cereus* needed to further investigations. In the same time the prevalence of *Bacillus cereus* in examined food and the contamination level were established.

The isolation and confirmation of *Bacillus cereus* strains were made according to ISO 7932/1997 procedure, on the basis of morphologic, cultural and metabolic characters. In addition, for the 43 of the isolated strains, selected for further characterization, the identification was made based on their detailed metabolic profile by using API 50CHB and API 20E tests.

From the 123 presumptive strains isolated from examined foods on MYP media 102 (82,92%) was confirmed as *Bacillus cereus* that indicate a good selectivity of MYP media. From the 43 strains confirmed by ISO 7932/1997 and API tests, only three strains could not be identified. For the three API rejected strains the system didn't eliminate the possibility of being *Bacillus cereus* but the small values of probability conducted to unacceptable profiles or without possibility of differentiation.

B. cereus was isolated from all types of examined foods, proving its wide spreading. The prevalence of bacteria was quite high but smaller than prevalence found by other researcher. The highest prevalence we found was in samples of spices, 31,03% of samples being contaminated and the smallest prevalence was observed in fresh sausages. Although the prevalence of *Bacillus cereus* in examined foods was relatively high the level of contamination found in food samples was small. The contamination level found in investigated food samples were between < 10 cfu/g or ml and 7.9×10^3 cfu/g or ml rarely exceeding the legal limits (in cases when limits were set) and never surpass the level regard as dangerous for consumers in literature. The highest levels of contamination were found in samples of spices.

In chapter VI that cover 7 sub chapters were assess the metabolic and physiologic characteristics and antibiotic resistance for 40 strains of *Bacillus cereus* selected from different types of foods. The selected strains were grouped in three category according to origin and two

category according to toxigenity, in order to highlight some important differences within and between categories.

Testing of biochemical characteristics of the 40 *Bacillus cereus* food isolated strains by API tests show a complex metabolic response, materialized by hydrolysis in different proportions of 23 from 49 tested carbohydrates and by metabolize of gelatin in 100% of cases. Variation of carbohydrates metabolism was found in connection with strains origin and toxigenity, but the magnitude of differences and the number of strains examined didn't allow us to establish trenchant correlations. However, strains isolated from milk and milk products showed fewer differences than the strains isolated from meat and meat products.

Temperature represents an important factor affecting the vital processes of microorganisms used in food industry to manage and model the development of microorganisms.

In subchapter 6.2 – 6.4 are presented the results of investigation carried out with the aim of evaluate the effect of temperature on bacterial growth, spores germination and bacterial sporulation in *Bacillus cereus* selected strains. The test temperatures limits were chosen taking count of common variations of temperatures along the chain that food go through from raw materials to consumption moment. The effect of temperatures was assessed by calculating the growth rate, germination rate and the rate of sporulation on the basis of mathematical models and formulas. The obtained results were statistically analyzed and interpreted.

The strains isolated from milk had more frequently the ability of growing at 7°C than strains isolate from meat and meat products which grew better at medium and high temperatures. This fact demonstrate the possibility of selection of *Bacillus cereus* strains during the processing and storage of foods

At 7°C in liquid media the sporulation process is totally inhibited, none of the tested strains sporulate at this temperature, that mean that in refrigerated foods the vegetative cell didn't sporulate. The sporulation rate values rise along with temperature rising; the highest values of sporulation rate were obtained at 37°C. We haven't obtained evident differences between values of average sporulation rate according to strains category.

Spores germination was affected by temperature variation. There were evident differences of spore germination according to strains origin and toxigenity. The spores of strains isolated from milk and milk products show the highest average germination rate at 20°C while the spores from strains isolated from meat and meat products germinate better at 30°C. Spores from strains included in "other foods" category show a great variation of values of sporulation rate and germination percentage.

Subchapter 6.5 deal with heat resistance of spores from *Bacillus cereus* food isolated strains. The heat resistance of spores was tested at 90°C, and evaluated by estimation of the time of decimal reduction (D_{90}) and the time until decimal reduction of spores (d). The D_{90} values range between 23,11 and 81,89 minutes. The D_{90} and d values which describe the behavior of heat treated spores show little differences between strain categories.

Statistical comparison of values of physiologic parameters tested in this study (subchapter 6.6) provided results that didn't permit establishing of stabile and obvious correlations between variations of the values of tested parameters.

The obtained values demonstrate once more the biodiversity inside the *Bacillus cereus* species aspect that make difficult the assessment of the risk posed by the presence of this bacterium in food.

The antibiotic resistance of *Bacillus cereus* food strains was tested both by classic method and by API ATB Vet tests (subchapter 6.7). Thirty one antibiotic substances were tested covering a broad spectrum of substances (macrolides, aminoglycoside, tetracycline, penicilins, cephalosporins, sulfonamides, polypeptides, quinolons). All the strains were resistant at nine of the 31 antibiotics (especially betalactamic ring antibiotics); 14 of antibiotics (mainly: aminoglycoside, macrolides, tetracycline, polipeptides and quinolones) were active on all the strains while 8 antibiotics exhibit an inconstant effect on *Bacillus cereus* strains. The results obtained in this study are mostly in line with the findings of other researchers working in this field, and confirm the well known antibiotic resistance of *Bacillus cereus*.

In chapter 7 are presented the results of investigation of toxigenic activity of *bacillus cereus* strains. The pathogenic activity of *bacillus cereus* was evaluated by “in vivo” tests on rabbits and on mice. Thirteen of the 40 tested strains (32,5%) were able to produce toxins that induce positive reaction in test animals.

The rabbit ileal ligated loop test was positive in 12 of the 40 tested strain (30%) being less sensitive than vascular permeability test performed on rabbit too that was positive in 13 of 40 strains (32,5).

Tests on mice were proved to be an useful instrument in proving the pathogenity of *Bacillus cereus* strains. The most sensitive variant of the test was intranasal instillation of bacterial culture. The intravenous injection of the culture gave similar results while the intra peritoneal inoculation was less sensitive.

Toxigenic strains were relatively uniform distributed among the three groups of strains. However, in milk and milk products category there are six of the 13 toxigenic strains while in meat and meat products

four strains was toxigenic and in “other foods” category only three strains.

Taking account of actual difficulties in applying advanced diagnostic tests in assessment of the toxigenicity of *Bacillus cereus* strains, the “in vivo” tests, used in this study, are very useful for pathogenic characterization of *Bacillus cereus*, even if they do not provide detailed information about the type of toxin responsible for the toxigenic effect.

Analysis of the 40 strains of *Bacillus cereus* allow us on the basis of the obtained results to affirm that inside of the *Bacillus cereus* there is a great diversity of bacterial response under the influence of used factors. From the food safety point of view this feature have a major consequence, because this kind of unpredictable behavior make very difficult to establish appropriate measures effective for all *Bacillus cereus* strains.

However, based on the results obtained the risk posed by presence of *Bacillus cereus* in foods can be diminished to an acceptable limit by combination of preventative measures designed to reduce prevalence of bacteria in foods and the level of food contamination with measures of keeping the temperature in limits that decrease drastically the growth rate and germination of spores.

Statistical conclusions concerning the biodiversity of *Bacillus cereus* strains should be based on a judicious selection of strains from different niches (food, environment, etc) in representative number. Other author sustain that at least 30 strains per each group are necessary for a good statistical analysis that is because in the majority of cases the bacterial population do not have a normal distribution. In conclusion further and deep analyses are necessary to complete the characteristics of *Bacillus cereus* species.