

مروری به ساختار ویرولانس باسیلوس سرئوس

• شب‌نم مولایی کهنه شهری

دانشگاه آزاد اسلامی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی و علوم پایه، واحد زنجان، زنجان، ایران

• جاوید تقی نژاد

دانشگاه آزاد اسلامی، گروه میکروبیولوژی، واحد ملکان، ملکان، ایران

j_taghinejad@yahoo.com

• دکتر حسن حسین زادگان

دانشیار باکتری‌شناسی، گروه علوم پایه، دانشکده علوم پزشکی مراغه، مراغه، ایران

چکیده

باسیلوس سرئوس باکتری گرم مثبت و اسپورزایی است که به عنوان عامل مسمومیت در مواد غذایی شناخته شده است. بسیاری از سویه‌های این باکتری باعث مسمومیت غذایی از نوع اسهالی و استفراغی می‌شوند. بیماری‌های نوع اسهالی توسط انتروتوکسین‌های همولیزین HBL، غیر همولیتیک NHE و سیتوتوکسین K ایجاد می‌شوند. باسیلوس سرئوس حاوی اسپور می‌باشد بنابراین می‌تواند شرایط نامناسب محیطی از جمله دما و کمبود ماده غذایی را تحمل نماید.

کلید واژه: مسمومیت غذایی، توکسین‌ها، باسیلوس سرئوس

مقدمه

باسیلوس سرئوس باکتری گرم مثبت، متحرک، هوازی اختیاری، دارای اسپور و اندازه آن در فرم رویشی یک تا دو میکرومتر در برخی موارد سه تا پنج میکرومتر است. اسپورهای بیضوی شکل در موقعیت مرکزی یا نزدیک مرکزی بدون تورم در اسپورانژیوم قرار دارد. این باکتری متحرک، دارای فلاژل‌های پیرامونی، هوازی-بی هوازی اختیاری با سلول‌های رویشی بزرگ است. باسیلوس سرئوس اکثراً به صورت زنجیره‌ای و با یک میکرومتر عرض می‌باشد. با وجود این که باسیلوس سرئوس می‌تواند چرخه زندگی کاملاً ساپروفیتی داشته باشد اما این ارگانیسم به عنوان بیماری‌زای فرصت طلب انسانی

نیز رفتار می‌کند (۳).

باسیلوس سرئوس در گیاهان و مواد غذایی می‌تواند رشد کند، همچنین سازگاری خوبی برای رشد دوره‌ای در حشرات و پستانداران دارد البته برخی از سویه‌های باسیلوس سرئوس از طریق غذا منتقل نمی‌شوند. این باکتری در مدفوع افراد سالم به میزان ۱۴ تا ۱۵ درصد حضور دارد و غالباً از محصولات لبنی از جمله پنیر و شیر ایزوله می‌شود (۲ و ۳). باسیلوس سرئوس توکسین‌های زیادی تولید می‌کند که غالباً دو نوع از این توکسین‌ها با مسمومیت‌های غذایی در ارتباط هستند: (۱) انتروتوکسین اسهالی ناپایدار در برابر گرما که هنگام گرم شدن غذا تخریب می‌شود (۲) توکسین استفراغی پایدار در برابر گرما که با گرم شدن غذا غیر فعال نمی‌شود. انتروتوکسین‌های ناپایدار در برابر گرما از طریق مواد غذایی خام منتقل می‌شوند (۷ و ۱).

شیوع بیماری‌های غذایی در سال‌های اخیر علی‌رغم پیشرفت در سطح بهداشت، افزایش یافته است. آلودگی‌های آبی و غذایی مهمی باعث شیوع بیماری و مرگ و میر در دنیا می‌شوند. دلیل این افزایش ممکن است آلودگی در تولیدات غذایی جهانی و تغییرات در تکنولوژی صنایع غذایی در کشورهای صنعتی باشد (۸). باسیلوس سرئوس ۹۰ درصد از باکتری‌های خاک را تشکیل می‌دهد. اسپور باسیلوس سرئوس به راحتی می‌تواند خشکی زیاد و دمای



بالای پاستوریزاسیون را تحمل کند و وقتی در دمای اتاق قرار می‌گیرد جوانه زده و رشد می‌کند. در نتیجه در تهیه پنیر محیطی مناسب برای جوانه زنی اسپور، رشد ارگانیزم و تولید توکسین ایجاد می‌شود و باعث آلودگی پنیرهای پاستوریزه و محلی می‌شود (۵ و ۴).

باسیلوس سرئوس مسئول دو نوع متفاوت از مسمومیت‌های غذایی است: اسهالی و استفراغی. بیماری اسهالی داری دوره کمون ۱۶-۸ ساعت است و دردهای شکمی و اسهال مشخص ایجاد می‌شود. این بیماری توسط انتروتوکسین‌ها ایجاد می‌شود که در طی رشد و رویش باسیلوس سرئوس در روده کوچک ایجاد می‌شود. نوع دیگر بیماری، استفراغی است که دارای دوره کمون ۵-۰/۵ ساعت می‌باشد و با حالت تهوع و استفراغ مشخص و توسط توکسین استفراغی ایجاد شده که به وسیله سلول‌های رویشی در غذا تولید می‌شود. دوز موثر برای مسمومیت غذایی باسیلوس سرئوس ممکن است از 10^6-10^8 سلول یا اسپور در گرم متغیر باشد. از این رو غذاهای دارای بیش از 10^4 باسیلوس سرئوس در گرم برای مصرف کننده غیرقابل استفاده است (۹). در سال‌های اخیر افزایش نگران کننده‌ای از عفونت‌های روده‌ای مربوط به این باکتری در افراد دیده شده است. اغلب، این عفونت‌ها در بیماران دارای نقص سیستم ایمنی وجود دارند. عفونت‌های روده‌ای این باکتری شامل اندوفتالمیت، باکتری، سپتی سمی، اندوکاردیت، پنومونی، مننژیت، گاستریت و عفونت‌های پوستی می‌باشند (۱ و ۷ و ۱۲).

باسیلوس

جنس باسیلوس در سال ۱۸۷۲ با گونه باسیلوس سوبتیلیس به ثبت رسید. گونه باسیلوس سرئوس حدود ۱۵ سال بعد شناخته شده یعنی اولین بار در سال ۱۸۸۷ از هوای طویله گاو به وسیله فرانک لند جدا سازی شد (۱۰). در نوشته‌های اروپایی قبل از سال ۱۹۵۰ چندین گزارش از سموم غذایی مربوط به جنس باسیلوس دیده شده است. در طول این مدت تعدادی از گونه‌های باسیلوس آنتراسیس از انواع مختلف عفونت‌های غیر روده‌ای - گوارشی جداسازی شده بود. به خصوص در سال‌های اخیر، اسناد و مدارکی مبنی بر افزایش تعداد و نقش باسیلوس سرئوس

در مسمومیت‌های غذایی ارائه شده است (۱۱). جنس باسیلوس گروهی بزرگ و متنوع از خانواده باسیلاسه است که دارای باسیل‌های گرم مثبت بزرگی هستند که هوازی-بی هوازی اختیاری بوده و توانایی تولید اندوسپور را دارند. فقط یکی از گونه‌های این جنس، گونه باسیلوس آنتراسیس عامل بیماری در انسان و حیوانات است. گونه‌های دیگری از این جنس وجود دارند که به طور وسیع در غذا، خاک مرطوب، آب و نمونه‌های گرد و خاک یافت می‌شوند و از خصوصیات متمایز کننده اعضای این جنس توانایی آن‌ها به بقاء در شرایط نامساعد است. باسیلوس‌ها از نظر غذایی سخت رشد نمی‌باشند و تنها به منبع کربن و نیتروژن همراه با نمک‌های معدنی نیاز دارند. این باکتری‌ها قادرند برای مدت‌های طولانی به صورت اسپور در خاک باقی بمانند (۱۲). بر خلاف اغلب جنس‌های باکتریایی، یکی از خصوصیات منحصر به فرد این جنس، محدوده بسیار وسیع گوانین و سیتوزن مولکول DNA در گونه‌های متفاوت (۶۲-۳۲ درصد مول) می‌باشد. این ویژگی نشان دهنده ناهمگونی بسیار شدید ارگانیزم درون جنس می‌باشد (۱۳).

باسیلوس سرئوس

این باکتری باسیل گرم مثبت، با اندازه $4-3 \times 1$ میکرومتر اسپوردار و هوازی-بی هوازی اختیاری از خانواده باسیلاسه است. این باکتری متحرک، همولیتیک فعال، کاتالاز مثبت، مقاوم به پنی سیلین، مانیتول منفی، فاقد رشد ریزوئید و حاوی سیستم فسفو لیپازی (لستیناز)، و مزوفیل می‌باشد. دمای مناسب رشد این باکتری ۳۰ تا ۳۵ درجه سلسیوس است. pH مناسب برای رشد آن ۹/۹ تا ۹/۳ است. گروه باسیلوس سرئوس به عنوان عامل مسمومیت غذایی از جنس باسیلوس‌ها شناسایی شده‌اند. این گروه شامل ۶ گونه متفاوت و مشابه هم زیر است: باسیلوس سرئوس، باسیلوس آنتراسیس، باسیلوس میکوئیدز، باسیلوس سودو میکوئیدز، باسیلوس تورنجینسیس و باسیلوس وین استفان سیس. از بین این باکتری‌ها، باسیلوس سرئوس بیشتر از دیگر باکتری‌های این گروه مسئول بیماری‌های ناشی از غذا می‌باشد. اخیراً یک پاتوژن جدید به نام باسیلوس نئوسرئوس هم بر اساس بررسی‌های توالی یابی ژن و درصد سیتوزین و گوانین در این قرار گرفته است (۱۷).



این باکتری در طبیعت به طور گسترده‌ای پراکنده است. باسیلوس سرئوس تا دمای ۴۸ درجه سلسیوس قادر به رشد بوده و در دمای پایین تر از ۷ درجه سلسیوس نیز رشد می‌کند. دمای مناسب رشد آن ۳۰ تا ۳۵ درجه سلسیوس است. باسیلوس سرئوس به ۳ اسید آمینه ترئونین، والین و لوسین نیاز دارد که این اسید آمینه‌ها فاکتورهای رشد هستند، اما به ویتامین‌ها نیازمند نیست (۱۸).

بعضی سویه‌های باسیلوس سرئوس برای انسان مضر هستند و می‌توانند یکی از علل مسمومیت‌های غذایی باشند، در حالی که سویه‌های دیگر می‌توانند به عنوان پروبیوتیک، برای حیوانات مفید واقع شوند. این باکتری انترتوکسین، همولیزین و لسیتیناز C ترشح می‌کند که در بیماری زایی و تشخیص آن مهم است (۱۸، ۱۹). مقایسه 16srRNA نشان می‌دهد که باسیلوس سرئوس بیشتر با باسیلوس آنتراسیس، عامل آنتراسیس (سیاه زخم) و باسیلوس تورنجینسیس، پاتوژن حشرات ارتباط دارد. اگر چه این باسیلوس‌ها خصوصیات مشابهی دارند ولی از باسیلوس سرئوس قابل تشخیص هستند و این اختلافات در جدول زیر ذکر شده اند (۲۲).

طبقه بندی باسیلوس سرئوس

گروه باسیلوس سرئوس شامل ۳ باکتری مختلف بر اساس (23sRNA, 16srRNA):

Bacillus thuringiensis

Bacillus . mycoides

Bacillus anthracis

و بعدها دو باکتری در این گروه قرار داده شد که سرما را تحمل کرده تحت عنوان باسیلوس پسودو میکوئیدز و باسیلوس وین استفان سیس در این گروه قرار گرفته است (۲۲). باسیلوس سرئوس در حال حاضر از لحاظ تاکسونومی به شرح زیر می‌باشد:

Domain: Bacteria

Phylum: Firmicutes

Class: Bacilli

Order: Bacillales

Family: bacillaceae

Genus: Bacillus

خانواده باسیلوس که مورد توجه بسیاری از میکروبیولوژیست‌ها بود، بعد از ۱۰۷ سال تلاش و کوشش در نهایت توسط فیشر در سال ۱۸۹۵ رده‌بندی شد (۲۳). در سال ۱۸۳۵ ویرو سوبتلیس توسط ارنبرگ جزء اولین باکتری‌هایی بود که شناسایی شد و کن در سال ۱۸۷۲ آن را به باسیلوس سوبتلیس تغییر نام داد (۲۴). باسیلوس سرئوس ۱۵ سال بعد از کشف باسیلوس سوبتلیس، در سال ۱۸۸۷ در یک گاوداری توسط فرانکنند جدا شد. در اروپا تا قبل از سال ۱۹۵۰ تعداد زیادی از مسمومیت‌های غذایی منسوب به باسیلوس‌ها وجود داشت. از اوایل سال ۱۹۵۰ گزارش‌هایی در مورد باسیلوس سرئوس، به عنوان ارگانسیم آلوده کننده غذا افزایش یافت. باسیلوس سرئوس در سال ۱۹۶۹ از بیمار مرده مبتلا به ذات الریه، از نمونه خون و مایع پرده جنب جدا شد (۲۵). گوردن و همکارانش در سال ۱۹۸۱ بسیاری از روش‌های مهم تشخیصی با سیلوس‌ها را طبقه بندی شده ارائه دادند. طبقه بندی ارائه شده روش سریعی بود، چون بر حسب دو خصوصیت رشد هوازی و تشکیل اسپور انجام شده بود (۲۶). رده بندی با تنوع ظاهری و با خصوصیات فنوتیپی (اندازه مخصوص و موقعیت اندوسپور در داخل سلول رویشی) و تغذیه، خصوصیات رشد و سوبستراهای مختلف و مشخصات فیزیولوژی پایه‌ریزی شده است. یافتن نوع گونه با بررسی خصوصیات فنوتیپی و اندازه‌گیری ترکیب بازهای DNA و هیبرید DNA-DNA انجام می‌شود. تنوع در نوع واکنش‌های متابولیک، نیازهای غذایی و محتویات ساختمان دیواره سلولی وجود دارد. در این جنس انواع سرما دوست، میانه دوست، گرما دوست و به همین ترتیب گونه‌های قلیا دوست، خنثی دوست و اسید دوست حضور دارند. برخی از اعضای جنس باسیلوس تولید کننده‌های آنتی‌بیوتیک می‌باشند مثل پلی میکسین و باسیتراسین که از نظر بالینی مفید هستند. بقیه گونه‌های درون این جنس به لحاظ این که در تولید صنعتی الکل‌ها، آنزیم‌ها و ویتامین‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند اهمیت دارند (۲۷).

اسپور

اسپورهای باسیلوس سرئوس شامل یک هسته مرکزی احاطه شده با غشای درونی و کورتکس و پوشش بیرونی، درونی و آگزوسپوریوم می‌باشند. هسته درونی دارای یک کپی از کروموزوم، فاقد mRNA، دارای مقادیر اندکی tRNA و تعدادی آنزیم می‌باشد. اسیدهای آمینه به صورت پروتئین‌های سیتوپلاسمی با وزن مولکولی پایین تحت عنوان پروتئین‌های اسیدی کوچک محلول (SASPs) ذخیره شده‌اند (۲۸). باکتری‌های گرم مثبت تحت شرایط نامناسب محیطی با تبدیل شدن به سلول‌های در حال کمون و به شدت مقاوم به نام اسپور از شرایط نامساعد محیطی فرار می‌کنند. این باکتری‌ها، به مواد ضد باکتریایی، حرارت، خشکی، یخ زدگی، سموم شیمیایی و دیگر فاکتورهای مضر محیطی مقاومت نشان می‌دهند (۲۹ و ۱۴ و ۲۹).

اسپورها با وجود مقاومت در شرایط نامناسب محیطی، غیر فعال هستند. اسپورها در حالت کمون تولید مثل ندارند و عملکرد آن‌ها بقاء باکتری در طی دوره استرس‌های محیطی است. اسپورهای بیضوی شکل در موقعیت مرکزی یا پارا مرکزی بدون تورم در اسپورانژیوم قرار دارند (۱۷). فعالیت متابولیکی مداومی در اسپور رسیده وجود نداشته و انرژی به صورت ۳- فسفو گلیسیرات که پایدارتر از ATP می‌باشد، ذخیره می‌گردد. مهم‌ترین مساله، وجود اسید دی‌پیکو لینک (DPA) در کورتکس، است که از بیوسنتز لیزین حاصل می‌شود. DPA که شلاته‌کننده کلسیم بوده و در کورتکس، کلسیم را جذب می‌کند (۳۰). باکتری‌های رویشی به طور معمول از حدود ۷۷/۵٪ آب ساخته شده‌اند. در حالی که تنها ۱۵٪ اسپور از آب تشکیل شده است. عقیده کلی بر این است که خشکی موجب مقاومت اسپورها به حرارت حتی تا درجه‌ای می‌شود که ساعت‌ها در دمای جوش زنده بماند (۳۱).

پوشش‌های اسپور از پروتئین و مقداری لیپید و کربوهیدرات تشکیل شده است که در مقاوم بودن به عوامل اکسیداسیون و شیمیایی شرکت می‌کنند. به علاوه ساختار بیرونی اسپور این اجازه را می‌دهد تا به گرما و تشعشع

مقاوم باشند. اسپور باسیلوس سرئوس فاکتوری مهم در مسمومیت‌های غذایی است و نقش مهمی در اپیدمیولوژی برخی بیماری‌ها ایفا می‌کنند. مطالعات نشان می‌دهند که اسپورها می‌توانند به سلول‌های Caco₂ در محیط کشت بچسبند و این موضوع بیانگر چسبیدن اسپورها به اپی تلیوم سلول‌های روده است (۳۲ و ۱۵ و ۱۰). اسپورهای باسیلوس سرئوس شامل یک هسته درونی (مرکز) احاطه شده با غشای درونی، کورتکس، پوشش بیرونی و درونی و آگزوسپوریوم می‌باشند. هسته درونی دارای یک کپی از کروموزوم، فاقد mRNA، دارای مقادیر اندکی tRNA و تعدادی آنزیم می‌باشد. اسیدهای آمینه به صورت پروتئین‌های سیتوپلاسمی با وزن مولکولی پایین تحت عنوان پروتئین‌های اسیدی کوچک محلول (SASPs) ذخیره شده‌اند (۲۷ و ۳۳).

اسپورزایی

باسیلوس سرئوس هنگامی که در شرایط سخت از لحاظ مواد غذایی و دمای نامناسب و غیره قرار می‌گیرد تولید اسپور می‌نماید. باکتری در سه حالت تولید اسپور می‌کند: هنگامی که در شرایط کمبود ماده غذایی از جمله نیتروژن (عامل رشد) یا فسفر (ماده معدنی) قرار می‌گیرد. مرحله بعدی هنگامی که تعداد باکتری بالا می‌رود تولید فاکتور ۱ تمایز خارج سلولی (EDF-1) که پپتید کوچک متصل شونده به باکتری دچار فقر غذایی و مواد سیگنال آغازین اسپورزایی است امکان پذیر می‌شود. مرحله آخر باکتری باید در فاز ساکن قرار گیرد.

فرآیند آغازین به تقسیم غیر متقارن باکتری و ایجاد یک پیش اسپور و یک مادر با ژنوم کامل منجر می‌شود. در طی چندین ساعت سلول مادر دیواره‌های حفاظتی (کورتکس و پوشش‌های اسپور) را اطراف پیش اسپور که از نظر سیستم متابولیکی به صورت نهفته در می‌آید ایجاد می‌کند و سلول مادر لیز می‌شود و اسپورها را در محیط رها می‌کند. تشکیل اسپور باسیلوس سرئوس زمانی اتفاق می‌افتد که مواد غذایی محیط کم باشد و در داخل یک سلول رویشی جوانه می‌زند. بیشتر از یک اسپور در هر سلول وجود ندارد. فرآیند تشکیل اسپور ۶ ساعت طول می‌کشد (۳۴).



جوانه زدن اسپور

جوانه زنی شامل وقایع تجزیه‌ای است که این وقایع باعث دوباره آب دار شدن هسته و تسهیل ورود مولکول‌ها از محیط خارج می‌شود.

از آن جا که اسپورها از لحاظ متابولیسمی در حال کمون هستند، باید به فعالیت رشدی خود برگردند که این امر در فرآیند جوانه زنی انجام می‌شود. اسید آمینه گلايسين، اسید آمینه‌های طبیعی دیگر و ریبوزیدهای پورین، جوانه زنی را کاهش می‌دهند. جوانه زنی اسپور باسیلوس سرئوس توسط چندین مهار کننده آنزیم شبه تریپسین، رخ نمی‌دهد (لوپتین، آنتی پین، توسیل لیزین کلرومتیل کتون). L-آلانین موثرترین اسید آمینه در تحریک جوانه زنی است (۳۵).

کل فرآیند اسپور زایی حدود ۶ ساعت به طول می‌انجامد، اما تنها ۹۰ دقیقه زمان برای جوانه زدن لازم است. این اختلاف زمان به این علت است که جوانه زدن فرآیند معکوس است که به صورت سه مرحله بدون کنترل در سطح رونویسی صورت می‌گیرد. مرحله اول که فعال سازی نام دارد هنگامی رخ می‌دهد که حرارت یا یکی از چندین ماده شیمیایی، یک گیرنده L-آلانین را که خود یک نوع پروتئاز است فعال نماید. مرحله دوم که مرحله آغازین نام دارد، در اثر مواجهه گیرنده فعال شده با L-آلانین برخی از اسید آمینه‌های خاص یا گلوگز آغاز می‌گردد. پروتئاز فعال شده در کورتکس، ورود آب و مواد غذایی به اسپور در حال جوانه زدن را تسهیل می‌نماید (۱۳). در طی مرحله دوم است که مقاومت به گرما و حالت انکسار در اسپور از بین رفته، همچنین دی پیکولینیک اسید و Ca^{2+} در محیط رها می‌شوند، توانایی جذب رنگ در اسپورها افزایش می‌یابد و اسپورها از نظر متابولیسمی فعال می‌شوند. در این زمان، مرحله سوم به نام رشد به خارج آغاز می‌شود. این مرحله موجب برگشت اسپور به حالت رویشی می‌شود (۳۶). آنزیم‌هایی مانند تریپسین ممکن است، در مکانیسم شکستن دوره نهفتگی اسپور باکتری باسیلوس سرئوس شرکت داشته باشد. جوانه زدن اسپور باسیلوس سرئوس ممکن است به طور نسبی توسط چندین ممانعت کننده جلوگیری شود، همانند

آنزیم‌های شبیه تریپسین از جمله: لیزین، کتون، لئوپتین و کلرامفنیکل همچنین بستری مصنوعی از آنزیم تریپسین نیز باعث مهار جوانه زنی اسپور باسیلوس سرئوس می‌شود. عصاره خامی که از جوانه زدن اسپور باسیلوس سرئوس تولید می‌شود حاوی آنزیم شبیه تریپسین می‌باشد که دارای فعالیت حساس به ترکیبات بازدارنده جوانه زنی مانند لئوپتین، لیزین- کلرو متیل کتون می‌باشد. سوسپانسیون اسپور باسیلوس نشان می‌دهد که مهار کننده فوق تحت شرایط جوانه زنی اسپور بخشی از مقاومت خود را در برابر حرارت و ۳۰-۱۰٪ از محتوی دی پیکولینیک اسید خود را از دست می‌دهند. در حین جوانه زنی اسپور قطعاتی از ۵ کتو فرین (گلیکو پروتئین متصل به آهن)، به وسیله حرارت دادن تریپتون در حضور سدیم تیوگلیکولات خود به خود تشکیل می‌گردد که این قطعات تشکیل شده مانع رشد فراتر اسپور باسیلوس سرئوس می‌شود (۱۹ و ۳۴ و ۳۷). نیترات تولید شده توسط باکتری نیز به عنوان عامل باکتریو استاتیک، باعث ممانعت از رشد فراتر اسپور باسیلوس می‌شود (۳۸ و ۳۹). غیر فعال شدن اسپور باسیلوس سرئوس در حین مرحله سرد شدن در دمای ۹۰ درجه سلسیوس در ۲ فاز رخ می‌دهد، فاز اول در حین سرد شدن از دمای ۹۰ تا ۸۰ درجه سلسیوس رخ می‌دهد، مرحله دوم در حین سرد شدن از دمای ۳۸ تا ۲۶ درجه سانتی گراد رخ می‌دهد. غیر فعال شدن اسپور زمانی رخ می‌دهد که اسپور در حرارت حداکثر ۸۰ درجه سلسیوس سرد شود. غیر فعال شدن اسپور در دماهای بین ۴۶ تا ۳۸ درجه سلسیوس به وسیله عملیات حرارتی بالاتر (۹۰-۸۰ درجه سلسیوس) تحریک می‌شود، جوانه زدن اسپور به غیر فعال شدن در دمای ۴۵ درجه و سپس حرارت دادن به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۰ درجه سلسیوس نیاز دارد (۴۰). رشد فراتر از مرحله توقف مرحله تورم می‌باشد. در دمای بهینه، کلرامفنیکل از سنتز پروتئین ممانعت می‌کند، رشد فراتر در مرحله تورم متوقف می‌شود، بنابراین سنتز پروتئین ممکن است، نقشی در مکانیزم غیر فعال سازی رشد فراتر اسپور در دمای ۴۵ درجه سلسیوس داشته باشد (۴۱). جوانه زدن اسپور باسیلوس سرئوس، در دمای کمتر از

۱۵ درجه سلسیوس در برنج در مقایسه با سویا، بیشتر رخ می‌دهد، بنابراین در این محیط سویه‌های اسهالی بیشتر از سویه‌های استفراغی گسترده شده است (۴۲). اسپور باسیلوس سرئوس در محیط حاوی اینوزین و یا L-آلانین به طور منحصر به فرد جوانه می‌زند. اسپور باسیلوس سرئوس (شامل سویه‌های اسهالی و استفراغی) به هر دو ژن GerQ و GerI به عنوان گیرنده‌های رویش، جهت جوانه زنی نیاز دارد. در حقیقت گیرنده GerL با همکاری GerI عهده دار بیشتر پاسخ‌ها به L-آلانین برای جوانه زدن منحصر به فرد اسپور می‌باشد ولی سهم GerI کمتر از گیرنده GerI می‌باشد. پروتئین GerT باسیلوس سرئوس از ۷۴٪ آمینو اسید تشکیل شده که در واقع همولوگ GerN می‌باشد که هر دو آنتی پورتر یون‌های Na/H/K، همچنین برای جوانه زدن نرمال اسپور به اینوزین نیاز دارند. پروتئین GerT نقش مهمی در رویش اسپور ندارد در حالی که برای رشد فراتر به آن نیاز دارد. اسپور موتانت به ژن GerT تحت شرایط قلیایی، کارایی در رشد فراتر ندارند، رشد فراتر خیلی آهسته تر از نوع وحشی در حضور غلظت بالایی از نمک صورت می‌گیرد (۴۳). پروتئین GerT در باسیلوس سرئوس به طور بارزی در رشد فراتر اسپور در شرایط استرس سدیم و شرایط قلیایی نقش دارد. جوانه زدن بسیاری از گونه‌های انتروتوکسیژنیک باسیلوس سرئوس در سلول‌های Caco₂ اتفاق می‌افتد که این تحریک جوانه زنی اسپور در سلول‌های Caco₂ به خاطر عملکرد نرمال گیرنده‌های جوانه زنی در این سلول‌ها می‌باشد که در سلول‌های HEP2 انجام نمی‌شود (۴۴).

پوشش سلولی باسیلوس سرئوس لایه‌های S

باسیلوس سرئوس بیماری‌زا دارای لایه‌های سطحی گلیکوپروتئینی به نام لایه S روی پتیدو گلیکان می‌باشد. لایه S، خارجی ترین ساختار پروتئینی تک لایه‌ای در باکتری‌ها می‌باشد و از زیر واحدهای مشابه پروتئینی یا گلیکوپروتئینی به وجود آمده‌اند. این لایه به واسطه خاصیت چسبندگی به سلول‌های میزبان، ممانعت از ورود

برخی آنتی بیوتیک و غیره خاصیت ویرولانسی دارد و حضور آن در باکتری باعث افزایش بیماری‌زایی می‌گردد. لایه‌های سطحی در بیماری‌زایی باسیلوس سرئوس نقش دارند، عملکرد آن در مقابل لکوسیت‌های پلی مورفونوکلئر افزایش می‌یابد. این لایه‌های سطحی هم چنین به لآمینین، کلاژن نوع فیبرونکتین و فیبرینوژن اپی تلیوم می‌چسبند و در افزایش اثر متقابل بین باسیلوس سرئوس و میزبان نقش دارند (۴۵).

کپسول

کپسول یک لایه پلی ساکاریدی یا پتیدی است که فضای خارجی پوشش سلول را احاطه می‌کند. وقتی که مواد کپسولی به صورت کاملاً سست با باکتری مرتبط بوده و به آسانی قابل جدا شدن باشند لایه لعابی گویند. این ساختارها برای بقا باکتری ضروری نیستند. کپسول باکتری‌های پاتوژن مانع بلع و کشته شدن باکتری توسط فاگوسیت‌ها می‌شوند. کپسول در باسیلوس آنتراسیس به عنوان فاکتور ویرولانسی می‌باشد که یک هموپلی پتید دی گلوتامیک اسید است. باسیلوس سرئوس کپسول کربوهیدراتی تولید می‌کند (۴۶).

فلاژل

بعضی گونه‌های باکتری‌ها متحرک و دارای اندامک‌های حرکتی به نام فلاژل بوده که از واحدهای تکرار شونده به نام فلاژلین تشکیل یافته است. فلاژل‌ها درون غشای سیتوپلاسمی قرار گرفته‌اند و در طول غشای سلولی امتداد یافته و به صورت یک رشته بلند ظاهر می‌شوند. باکتری‌هایی که این توانایی را دارند قادرند که محیط اطراف شان را بسنجند و به یک ماده شیمیایی خاص غذایی یا سمی واکنش نشان داده و به سمت آن رفته یا از آن دور می‌شوند (کمو تاکسی). باسیلوس سرئوس به وسیله فلاژل‌های پیرامونی، دو نوع حرکت شناوری و گروهی را نشان می‌دهد که استفاده از هر نوع حرکت، به محیط بستگی دارد. سلول‌های تکی، حرکتی شناور را توسط فلاژلی کوتاه و میله‌ای نشان می‌دهند. از طرف دیگر، سوآرمینگ، حرکتی دسته جمعی از یک گروه سلولی دارای تاژک است و همچنین سلول‌هایی که از حرکت سوآرمینگ استفاده می‌کنند ۴۰ برابر سلول‌های شناور، دارای فلاژل هستند (۴۷).



دیواره سلول

در باسیلوس سرئوس پروتئین‌های پلی ساکاریدی ۵۰ درصد از دیواره سلولی را تشکیل می‌دهند و شامل یک پلی ساکارید خنثی مرکب از N استیل گلوکز آمین، N استیل گالاکتوز آمین و گلوکز با نسبت ۱:۱:۴ می‌باشد. تقریباً دیواره سلولی تمام گونه‌های باسیلوس متشکل از پپتیدوگان مزو-دی آمینوپایمیلیک است. عملکرد پپتیدوگلیکان در برقراری شکل سلول است. مشخصه اسیدی دیواره سلولی در باسیلوس سرئوس داشتن واحدهای تکراری تتراساکاریدی است. اتصالات عرضی بین موروپپتیدها دایمرها هستند و تعدادی از موروپپتیدها گروه N استیل را ندارند. دیواره باسیلوس علاوه بر پپتیدوگلیکان دارای مقدار زیادی پلی مر غیر یونی مانند اسید تیکوئیک متصل به مورامیک اسید می‌باشند که ۵ درصد از دیواره سلولی را تشکیل می‌دهد. نوع این پلی مرها غیر یونی به میزان فسفات و منیزیم محیط کشت بستگی دارد.

غشاء

غشاء سیتوپلاسمی دارای سه قسمت بوده که از پروتئین (۷۰-۶۰ درصد)، لیپید و فسفولیپید (۳۰-۲۰ درصد) و مقدار کمی کربوهیدرات تشکیل شده است. فسفو لیپیدها (فسفولیپیدهای اصلی شامل فسفاتیدیل گلیسرول، دی فسفاتیدیل گلیسرول و فسفاتیدیل گلیسرول نولامن) به صورت دو لایه و به گونه‌ای قرار گرفته اند که انتهای قطبی به سمت بیرون بوده و پروتئین‌های غشایی در این دو لایه لیپیدی شناور هستند. تنوع زیادی در مقدار لیپیدها و اسیدهای چرب غشاهای باسیلوس پیدا شده است. خصوصیات فیزیکی غشاء در اسپورزایی و جوانه زنی تغییر کرده و باعث تغییراتی در ترکیبات لیپید غشاء می‌شود (۴۸).

رشد و بقا باسیلوس سرئوس

رشد و بقا باسیلوس سرئوس به دما، pH، اکسیژن و فعالیت آبی بستگی دارد (۴۹).

دما

دمای بهینه برای رشد باسیلوس سرئوس ۳۷-۳۰ درجه سلسیوس است. بعضی سویه‌ها در دمای ۵۵ درجه

سلسیوس و بعضی دیگر در دمایی کمتر از ۵-۴ درجه سلسیوس رشد می‌کنند. محدوده دمایی رشد باسیلوس سرئوس ۴۹-۷ درجه سلسیوس است. سلول‌های رویشی با حرارت از بین می‌روند اما اسپورها مقاوم به گرما هستند. دمای جوانه زنی اسپور ۳۰-۸ درجه سلسیوس است. مقاومت به گرما در غذاهای روغنی و چرب و همچنین در غذاهایی با رطوبت کم، افزایش می‌یابد. اسپورها در گرمای خشک بیشتر از گرمای مرطوب مقاوم هستند. توکسین استفراغی به شدت به گرما مقاوم است (۱۲۶) درجه سلسیوس را ۹۰ دقیقه تحمل می‌کند) و توکسین اسهالی در ۵۶ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه غیرفعال می‌شود (۵۰).

pH

بیشترین و کمترین مقدار pH برای رشد باسیلوس سرئوس به ترتیب ۹/۳ و ۴/۳ می‌باشد. رشد باکتری در حضور ۰/۱ درصد اسید سولفوریک مهار می‌شود (۵۱).

اکسیژن

باسیلوس سرئوس در حضور و غیاب اکسیژن به خوبی رشد می‌کند. ولی تولید توکسین در شرایط بی هوازی کمتر است (۲۷).

فعالیت آبی

حرکت آب از محیط به سیتوپلاسم و از سیتوپلاسم به محیط را فعالیت آبی می‌نامند. کمترین مقدار فعالیت آبی (a_w) برای رشد سلول رویشی ۰/۹۵۰-۰/۹۱۲ است. اسپورها برای مدت طولانی در غذاهای خشک شده باقی می‌مانند (۵۲).

اکولوژی باسیلوس سرئوس

سویه‌های باسیلوس سرئوس اکثراً ساپروفیت هستند و انتشار وسیعی در طبیعت دارند و غالباً از خاک و گیاهان در حال رشد و همچنین دستگاه گوارش حشرات و پستانداران جدا می‌شوند. انتشار وسیع این باکتری‌ها ناشی از مقاومت اسپورها به استرس‌های گوناگون و بقا طولانی آن‌ها در شرایط نامساعد است (۵۳). باسیلوس سرئوس با میکروارگانیسم‌های دیگر در ریزوسفر (ناحیه اطراف ریشه گیاهان) اثر متقابل دارد. باسیلوس سرئوس می‌تواند بیماری‌های گیاهی ایجاد شده توسط پاتوژن‌ها را مهار کند

و نیز رشد گیاهان را افزایش می‌دهد (۲۹). این باکتری مولد آنتی بیوتیک‌های آزوترمایسین A و کانوزامن است. این آنتی بیوتیک‌ها رشد پاتوژن‌های گیاهی، اوومیسیت‌ها (تک یاخته)، برخی قارچ‌ها و تعداد کمی از گونه‌های باکتریایی را مهار می‌کنند (۵۴).

باسیلوس سرئوس به عنوان یک هم زیست روده‌ای در بند پایانی مثل شپش چوب، سوسک و موریانه نیز دیده می‌شود. این باکتری همچنین در روده پستانداران وحشی کوچک مثل جوندگان و حشره خوارها کلنی تشکیل می‌دهد (۵۵).

باسیلوس سرئوس به علت وسعت گسترش زیادش در محیط، می‌تواند وارد چرخه مواد غذایی خام شود و همچنین مقاومت زیاد اسپورهای باسیلوس سرئوس به باکتری این امکان را می‌دهد که در برابر فرآیندهای پخت و پز و خشک شدن مقاوم بماند که این مساله مشکل اصلی در آلودگی مواد غذایی مورد استفاده است. این باکتری مسئول ۲۵ درصد از مسمومیت‌های غذایی ناشی از تولید توکسین استفراغی و انتروتوکسین‌ها می‌باشد (۵۶ و ۵۱).

فاکتورهای ویروالانس

باسیلوس سرئوس‌ها تعداد زیادی از آنزیم‌ها و سیتوتوکسین‌ها را تولید می‌کنند که در مسمومیت‌های اسهالی دخالت دارند. سه سیتوتوکسین Hbl (همولیزین BL)، Nhe (غیر همولیزین) و سیتوتوکسین K به طور معمول به عنوان عامل اتیولوژیکی در مسمومیت‌های غذایی نوع اسهالی باسیلوس سرئوس مطرح هستند. همولیزین BL و توکسین غیرهمولیتیک Nhe از توکسین سه جزئی و سیتوتوکسین K از توکسین‌های تک جزئی است و به خانواده β barrel (توکسین‌های تشکیل دهنده منفذ) تعلق دارد. همچنین چندین سیتوتوکسین پروتئینی، همولیزین‌ها و آنزیم‌های تجزیه‌ای دیگر نیز شناخته شده‌اند که احتمالاً در مسمومیت اسهالی باسیلوس سرئوس دخالت دارند. این توکسین‌ها شامل سرولیزین O، همولیزین A2, Inh II, (متالوپروتئاز) و سه نوع فسفولیپاز C هستند (۶۰).

فسفولیپاز و اسفنگو میلیناز

فسفولیپاز تولید شده توسط باسیلوس سرئوس، مشابه

α توکسین کلسترییدیوم پرفرنجنسیس می‌باشد. فسفولیپاز و اسفنگومیلیناز ابتدا به عنوان توکسین شناخته شدند، اما اکنون ثابت شده که این دو آنزیم غیر توکسیک هستند. فسفولیپاز باسیلوس در دمای ۴۵ درجه سلسیوس فعال می‌باشد. این فسفولیپاز یک متالوپروتئین کوچک به وزن مولکولی ۲۳۰۰۰ دالتون است که دارای دو اتم روی (Zn^{2+}) است. اسفنگو میلیناز، پروتئینی با وزن مولکولی بین ۴۱۰۰۰ تا ۲۳۳۰۰ دالتون است که برای فعالیت به کاتیون‌های دو ظرفیتی نیازمند است (۶۱).

سرولیزین

سرولیزین، سیتولیزین وابسته به کلسترول است که شامل دو باقی مانده اسید آمینه سیستئین است. در غیاب دی تیورتیتول، اکسایش خود به خودی در شکل گیری فرم اکسید شده توکسین حاصل می‌شود. بنابراین سرولیزین، با تیول فعال می‌شود که شبیه استرپتولیزین استرپتوکوکوس پیورنز، پنومولیزین استرپتوکوکوس پنومونیا و لیستریولیزین لیستریا مونوسایتورنز می‌باشد. سرولیزین به وسیله عوامل احیاء کننده تیول مانند سیستئین، ۲-مرکاپتواتانول، دی تیورتیتول و سدیم تیو گلیکولات فعال می‌شود و به وسیله استرول‌ها، غیر فعال می‌شوند. نتایج تعیین توالی نوکلئوتید، حضور ۲ ژن به طور نزدیک فضا بندی شده را تایید می‌کند. محل اتصال ریبوزوم بر cerA که شامل یک حلقه باز ۵ بالقوه مجاور یک ساقه ۸ جفت بازی کاملاً مکمل می‌باشد. ژن‌های cerA و cerB مجاور مناطقی هستند که قادر به تشکیل ساختارهای ثانویه می‌باشند. بالا دست ژن cerA، دو دسته از توالی‌های تکراری معکوس شده در بازهای (۱۹۰- تا ۶۷) می‌باشند سرولیزین به عنوان همولیزین I نیز شناخته می‌شود. وزن مولکولی سرولیزین ۵۵ کیلو دالتون است و ظاهراً نقشی در بروز علائم التهاب معده‌ای - روده‌ای ناشی از مصرف مواد غذایی ندارد (۶۲).

توکسین غیرهمولیتیک (Nhe)

NHE یک سم چند جزئی است. ترکیبات مختلف زیر واحدهای NHE، درجه‌ای از فعالیت بیولوژیکی را دارند اما فعالیت ماکزیم تنها زمانی حاصل می‌شود که همه اجزا موجود با هم هستند. تشابه توالی اسید آمینه N ترمینال بین



L1 از HBL و زیر واحد ۳۹ کیلو دالتونی از NHE و نیز بین زیر واحد ۴۵ کیلودالتونی و L2 از NHE وجود دارد که نقش‌های عملکردی مشابه را در نژادهای باسیلوس سرئوس مختلف نشان می‌دهد (۶۳).

توکسین سه جزء Nhe برای اولین بار از سویه باسیلوس سرئوس در یک مسمومیت غذایی در نروژ جدا گردید. پروتئین‌های این توکسین متفاوت از HBL بودند و فعالیت همولیتیکی آشکاری نداشتند (۴۸). بررسی اپرون کد کننده دو جزء NheA و NheB یک ژن جدید را در این اپرون نشان می‌دهد که کد کننده پروتئین NheC است (۴۸). زیر واحدهای NHE عبارتند از NheB و NheC و NheA هر دو فعالیت بیولوژیکی مشابهی دارند. NHE نیز مثل HBL پروتئینی چند جزئی است. حداکثر فعالیت انتروتوکسین زمانی است که همه اجزاء آن حضور داشته باشند. به ترتیب بین L1 و L2 از HBL و زیر واحدهای ۳۹ و ۴۵ کیلو دالتونی از NHE در توالی اسید آمینه‌ای N ترمینال همولوژی وجود دارد (۳۳). Nhe تقریباً توسط همه سویه‌های باسیلوس سرئوس تولید می‌شود. Nhe، سمی سیتوتوکسیک برای سلول‌های Vero می‌باشد (۴۸). فعالیت سیتوتوکسیکی Nhe از طریق لیز اسمزی کلونیدی که روی سلول‌های اپی تلیال اثر دارد از طریق ایجاد منفذ در غشای پلاسمایی به وجود می‌آید (۴۹). انتروتوکسین غیر همولیتیک NHE شامل سه پروتئین با وزن مولکولی ۳۹، ۴۵، ۱۰۵ کیلو دالتونی است. حداکثر فعالیت سیتوتوکسیکی در سلول‌های vero زمانی است که نسبت‌های NheA، NheB، و NheC حدود ۱:۱۰:۱۰ باشند. بنابراین، افزایش زیاد NheC، فعالیت سیتوتوکسیکی Nhe را مهار می‌کند (۶۴).

ژن‌های و تنظیم رونویسی ژن NHE

۳ پروتئین Nhe توسط اپرون nhe که شامل nheA، nheB، و nheC است کد می‌شود (۴۸،۵۰) تنظیم کننده‌های رونویسی توصیف شده برای HBL همچنین در بیان ژن nhe فعال هستند. وجود PlcR-box در ناحیه پرموتور اپرون nhe برای فعال سازی رونویسی ژن nhe ضروری است (۴۲،۵۱). ResD و Fnr مستقیماً با ناحیه پرموتور اپرون ساختار ژن nhe واکنش دارند و

بیان این ژن را فعال می‌نمایند و همچنین CcpA، بیان این اپرون را با اتصال به جایگاه CRE مهار می‌کند (۴۴،۵۲) با وجود این که تنظیم کننده‌های بیان ژن nhe و hbl ظاهراً همانند هستند، اما آنالیز موتانت‌های ناقص در ژن‌های fnr و ccpA، اثرات متفاوتی را روی بیان و ترشح این توکسین‌ها نشان می‌دهند. در باسیلوس سرئوس‌های موتانت در ژن fnr ترشح Nhe نسبت به ترشح HBL بیشتر است. موتانت فاقد ژن ccpA، بیان بسیار بیشتری از اپرون ژن nhe را نسبت به اپرون ژن hbl در فاز سکون نشان می‌دهد (۵۷).

ترشح NHE

وجود توالی‌های پپتیدی مشخص در سه جزء پروتئین Nhe پیشنهاد می‌کند که ترشح آن‌ها از طریق سیستم Sec رخ می‌دهد. ترشح Nhe در باسیلوس سرئوس تحت تاثیر FlhF قرار می‌گیرد. FlhF سیگنال شناسایی ذرات پروتئینی است که همولوژی بالایی با پروتئین‌های Ffh و FtsY (برای انباشتگی خارج سلولی پروتئین در اشریشیاکلی و باسیلوس سوبتیلیس ضروری هستند) دارد. باسیلوس سرئوس موتانت در FlhF، تقریباً افزایش ۲۰ درصدی در ترشح Nhe را نشان می‌دهند، به علاوه ترشح همه پروتئین‌های خارج سلولی را نیز افزایش می‌دهند (۴۷). موتانت‌های FlhF باسیلوس سرئوس، تعداد فلاژل کمتری در سطح سلول هایشان دارند و در نتیجه ترشح HBL کاهش می‌یابد (ترشح HBL وابسته به فلاژل است). ترشح Nhe نیازی به فلاژل ندارد و این فرضیه را تقویت می‌کند که ترشح Nhe از طریق مکانیسم وابسته به Sec اتفاق می‌افتد (۶۶).

سیتوتوکسین K

سیتوتوکسین K پروتئینی ۳۴ کیلو دالتونی است و همولیز IV نیز نامیده می‌شود. این توکسین، فعالیت سیتوتوکسیکی شدیدی در برابر سلول‌های Vero دارد. این توکسین سبب سوراخ گردیدن لیپید دولایه می‌شود که براساس این اطلاعات حدس زده می‌شود که مکانیسم عمل آن در ایجاد اسهال از طریق ایجاد سوراخ در غشاء سلول‌های اپی تلیال می‌باشد (۵۷). در نتیجه باعث رها شدن مواد سیال داخل سلول می‌شود و به دنبال آن باعث

مثبت، روی سلول‌های Vero اثری خنثی دارد که این موضوع نشانگر عدم دخالت توکسین T در مسمومیت‌های غذایی است (۵۷). انتروتوکسین T قادر به ایجاد تجمع مایع در حلقه‌های دوازده روده خرگوش می‌باشد و نفوذ پذیری عروقی پوست خوکیه هندی را تغییر می‌دهد و سمیت سلولی را برای سلول‌های Vero نشان می‌دهد (۳۸،۵۵،۶۶).

توکسین استفراغی

توکسین استفراغی (سرئولید) در سال ۱۹۹۵ به عنوان یک دودکادپسی پپتید شناسایی شده است. سرئولید شامل سه تکرار از دو اسید آمینه و دو هیدروکسی اسید (D-O-leu-D-Ala-L-O-Val-I-Val) تولید شده توسط پپتید سنتتاز غیر ریپوزمی (NRPS) می‌باشد که توسط ژن NRPS رونویسی می‌شود. ساختار سرئولید حلقه‌ای شبیه والینومایسین تولید شده توسط سویه‌های استریپتومایسس است. سرئولید و والینومایسین هر دو منافذ یونی پتاسیم هستند. بنابراین فعالیت میتوکندری را با اکسیداسیون اسیدهای چرب مهار می‌کنند (۵۸،۵۹). سم استفراغی باسیلوس را در هیچ غذای کارخانه‌ای و مواد مرطوب و خام نمی‌توان یافت (۱۶). گزارش‌های مبنی بر بروز علائم این بیماری ناشی از آلودگی غذایی باسیلوس سرئوس در حدود ۲۲٪ - ۱٪ از کشورهای آمریکایی شمالی، اروپا و ژاپن وجود دارد. در هلند و نروژ طبق گزارش‌های آلودگی غذایی باسیلوس سرئوس یک مشکل اساسی محسوب می‌شود. سندرم استفراغی دارای شیوعی ده برابری نسبت به بیماری اسهالی است در حالی که در اروپا بیماری اسهالی فرکانس بیشتری دارد، این تفاوت در شیوع تیپ بیماری به خاطر تفاوت در نحوه آماده سازی و پخت غذا در کشورهای مختلف است (۶۲). در سویه‌های تولید کننده سرئولید، ژن سنتز کننده آن (ces) به اندازه 24Kbp، روی پلاسمید بزرگ ۲۰۰ Kbp، قرار دارد (۶۰). سرئولید به گیرنده‌های 5-HT3 متصل می‌شود و تحریک عصب واگ آوران را افزایش می‌دهد. بنابراین سرئولید باعث بروز تهوع و استفراغ می‌شود. این اثر سرئولید باعث نقص کبد می‌شود. تزریق درون صفاقی با دوز بالا از سرئولید سنتز شده، اختلال زیادی در

تخریب سلول‌های اپی تلیال می‌شود. یک سیتوتوکسین (CytK) از یک سویه باسیلوس سرئوس جداسازی شده است که موجب شیوع مسمومیت غذایی شدید شده است. CytK یک پروتئین ۳۴ کیلو دالتونی بسیار سمی برای سلول می‌باشد و نکروتیک و همولیتیک می‌باشد. توالی اسید آمینه‌های سیتوتوکسین K شباهت‌هایی به لوکوسیدین‌ها، گاما همولیزین، آلفا همولیزین استافیلوکوکوس اورئوس و بتا توکسین کلستریدیوم پرفرینجنس و همولیزین باسیلوس سرئوس دارد. همه توکسین‌های نام برده به خانواده توکسین‌های تشکیل دهنده منفذ (β -barrel) تعلق دارند. سیتوتوکسین K فعالیت انتروتوکسیکی علیه سلول‌های اپی تلیال روده‌ای و همچنین توانایی تشکیل منافذ، در لپید دو لایه را دارد. سیتوتوکسین K در دو فرم متفاوت cytK1 و cytK2 وجود دارد. cytK1، عموماً از سویه NVH391/98 جدا شده است و فعالیت توکسیکی آن روی سلول‌های Caco روده‌ای انسان و سلول‌های Vero، ۵ برابر بیشتر از cytK2 است. اما دیگر سویه‌های حامل cytK1 به اندازه سویه NVH391/98 خاصیت توکسیکی ندارند و این موضوع نشان می‌دهد موضوع تنوع فعالیت سیتوتوکسیکی در ارتباط با تنوع در سطوح بیان ژن است (۵۳). سیتوتوکسین K توسط ژن cytK کد می‌شود. بیان این ژن توسط PlcR از طریق پیوندش با PlcR-box در توالی پروموتور ژن cytK تنظیم می‌شود. بیان متفاوت ژن cytK، در موتانت‌های ccpA مشاهده نشده است. بنابراین پیشنهاد شده که بیان ژن cytK با پروتئین CcpA غیر مرتبط است (۴۴،۵۱،۵۵). اخیراً ژن cytK تقریباً در ۸۵ درصد از سویه‌های باسیلوس سرئوس و باسیلوس سوبتیلیس جدا شده است (۵۷،۶۵).

انتروتوکسین T

انتروتوکسین T یک انتروتوکسین با یک زیر واحد می‌باشد که دارای یک واحد توکسینی ۴۱ کیلودالتونی است و از نظر فعالیت بیولوژیکی مشابه NHE،HBL می‌باشد. ژن کد کننده این توکسین bcet است. شواهدی مبنی بر وجود این توکسین در مسمومیت‌های غذایی ناشی از باسیلوس سرئوس موجود نمی‌باشد. عصاره سلولی سویه‌های باسیلوس سرئوس دارای ژن bceT



هپاتوسیت‌ها ایجاد می‌کند. ترمیم تغییرات آسیب شناسی و احیاء هپاتوسیت‌ها بعد از ۴ هفته مشاهده می‌شود. سرئولید همچنین باعث آسیب بافت سلولی و نیز مهار کشتندگی طبیعی سلول‌های سیستم ایمنی انسان می‌شود (۶). این توکسین به گرما، آنزیم‌های پروتئولیتیک و pH اسیدی مقاوم است اما آنتی ژنتیک نیست. وزن مولکولی این توکسین کمتر از ۵۰۰۰ کیلو دالتون است. تولید بهینه توکسین استفراغی در برنج انکوبه شده ۳۰-۲۵ درجه سلسیوس طی مرحله سکون فاز رشدی ارگانسیم انجام می‌شود. ترکیبات لبنی و حبوبات بیشتر از برنج و ترکیبات غیر لبنی باعث تولید سرئولید می‌شوند. در صورتی که برنج پخته و غذاهای نشاسته‌ای هم مقدار زیادی سرئولید تولید می‌کنند (۶۷).

توکسین همولیزین BL

توکسین همولیزین BL منافذی را در غشاءهای سلول یوکاریوتی تشکیل می‌دهند که هر یک از اجزاء این سم به صورت مستقل و قابل برگشت به غشاء متصل می‌شوند که در این هنگام اجزاء الیگومریزه می‌شوند و منافذ عرض غشایی را تشکیل می‌دهند که شامل حداقل یکی از هر سه جزء هستند. قطعات عرض غشایی در B و L1 به عنوان میانجی‌های الیگومریزاسیون به کار گرفته می‌شوند. تا کنون گیرنده‌های غشایی این توکسین شناسایی نشده است. درجه بالای از ناهمگنی مولکولی در HBL نژادهای مختلف وجود دارد. در یک مطالعه ۱۲۷ ایزوله باسیلوس سرئوس به وسیله آنالیز وسترن بلات، ۴ سایز از B (۴۶،۴۲،۳۸،۴۴ کیلو دالتونی)، دو L1 (۳۸ و ۴۱ کیلو دالتونی) و سه L2 (۴۳، ۴۵ و ۴۹ کیلو دالتونی) شناسایی شدند. نژادهای انفرادی، ترکیب‌های مختلف باندهای چندتایی از هر جزء را تولید می‌کنند. علاوه بر این، بعضی از نژادها تنها یکی دو تا از سه جزء HBL را تولید می‌کنند. توکسین HBL دارای ۳ جزء B، L1 و L2 می‌باشد که توسط باسیلوس سرئوس تولید می‌شود. انتروتوکسین HBL در برابر گرما ناپایدار و نسبت به پروتئازها حساس است. فعالیت این انتروتوکسین شامل تحریک آدنیلات سیکلاز حلقوی (cAMP) در روده است که احتمالاً در عفونت‌های غیر گاستروانتریتی نقش دارند. احتمال این

که سم اسهالی باعث بیماری شود بسیار پایین است، چون این انتروتوکسین در دستگاه گوارش تخریب می‌شود و همچنین تعداد سلول‌های مورد نیاز برای تولید مقدار قابل توجهی از توکسین در غذا بسیار بیشتر از تعداد سلول‌های مورد نیاز برای ایجاد بیماری است که این باعث می‌شود تا غذا برای مصرف کننده غیر قابل استفاده باشد (۶۸). توکسین HBL طی فاز تاخیری رشد در دمای بهینه ۳۷-۳۲ درجه سلسیوس در روده کوچک سنتز و ترشح می‌شود. این توکسین در محیط‌های رشد، در محدوده دمایی ۴۸-۱۸ درجه سلسیوس فعال است. pH محیط کشت معمولاً با هیدرولیز کربوهیدرات‌ها کاهش یافته و در نتیجه تجزیه پروتئین‌ها افزایش می‌یابد. وقتی که pH محیط به کمترین مقدار برسد، مقدار بهینه انتروتوکسین تولید می‌شود (۶۹). این توکسین سه جزئی فعالیت همولیز، سیتولیز، درمونکروز، نفوذپذیری رگی و انتروتوکسیک را نشان می‌دهد و عامل حدود ۵۰ درصد از مسمومیت سلول‌های چشمی توسط عصاره سانتریفیوژ شده باسیلوس سرئوس در عارضه اندوفتالمیتیس می‌باشد. تزریق خوراکی این انتروتوکسین در میمون‌های رسوس، باعث اسهال می‌شود (۴۰). HBL توسط آزمایش‌های وسترن بلات و انتشار ایمنی خالص می‌شود (۷۰).

ساختار و فعالیت بیولوژیکی HBL

همولیزین BL یک سیستم لیز غشایی مرکب از ۳ پروتئین مجزای آنتی ژنی B، L1 و L2 است. این پروتئین‌ها به طور مستقل ترشح می‌شوند و هر سه برای حداکثر فعالیت بیولوژیکی این توکسین ضروری هستند. تاکنون فعالیت توکسیکی شناسایی شده برای HBL شامل درمونکروتیک، سیتوتوکسیک، همولیز، نفوذپذیری عروق، نکروز پوست، تخریب بافت‌های روده‌ای، نکروز و التهاب چشمی می‌باشد، توکسین HBL باعث تجمع مایع در لوب‌های ایلئال گره زده خرگوش می‌شود که یک تست قطعی برای آشکار شدن فعالیت انتروتوکسین‌های اسهالی می‌باشد. در این آزمایش، فعالیت HBL مشابه با توکسین کلرای وبا می‌باشد. بنابراین این توکسین می‌تواند یک فاکتور ویرولانسی اولیه در باسیلوس سرئوس اسهالی باشد. HBL تقریباً توسط ۶۵-۴۵ درصد از سویه‌های باسیلوس

سرئوس ترشح می‌شود، اما مقدار ترشح HBL سویه‌های مختلف متفاوت است (۷۱). ویژگی مشخص HBL، همولیز ناپیوسته غیر معمول در بلاد آگار می‌باشد. زمانی که HBL از کلنی باکتری در بلاد آگار ترشح می‌شود لیز به طور پیوسته از نواحی دورتر از کلنی شروع می‌شود و ناحیه‌ای حلقوی شکل و واضح تشکیل می‌دهد که به سمت کلنی حرکت می‌کند (۱۸). سه پروتئین HBL آزادانه به اریتروسیت‌ها متصل می‌شوند و اجزاء HBL در اتصال به غشاء یک کمپلکس غشایی را تشکیل می‌دهند که باعث لیز توسط مکانیسم اسمزی کلئیدی می‌شوند (۳۸). ساختار کریستالی جزء B از HBL با اشعه ایکس شامل یک مجموعه α هلیکس و یک دومن با سر کوچک α/β می‌باشد (دومن α/β به غشاء سلول‌های مخصوص چسبیده و وارد می‌شود). این ساختار HBL شدیداً شبیه همولیزین E در اشرشیاکالی (HlyE) می‌باشد با این تفاوت که توالی همولوژیک خیلی کمی دارند. این دو توکسین روش مشترکی در تشکیل منفذ دارند. همولوژی ساختاری جزء B از HBL و HlyE، یک مدل در تشکیل منفذ را پیشنهاد می‌کند که شامل الیگومریزاسیون جزء B به صورت هپتامر و اکتامر است. این مدل نیازمند سه جزء HBL برای همولیز است که با تغییرات شکلی در جزء B یا سر دومین با استفاده از اجزاء L_1 و L_2 در الحاق به غشاء صورت می‌گیرد (۲۸،۷۲). توالی‌های اسید آمینه سه پروتئین HBL نشان می‌دهد که دارای همولوژی ۲۴-۲۰ درصدی هستند. تجزیه ساختار پروتئینی HBL نشان می‌دهد که هر سه جزء آن دارای ساختار آلفا هلیکس هستند. اجزاء B و L_1 به ترتیب دارای قطعات ناقل غشایی ۱۷ و ۶۰ اسید آمینه‌ای هستند در حالی که L_2 شامل قطعه ناقل غشایی نیست. هتروژنیسیته مولکولی در HBL در سویه‌های مختلف وجود دارد. برای فعالیت بیولوژیکی HBL، هر سه جزء لازم است (۴۷،۵۷). قدرت همولیتیکی HBL به گونه پستانداران وابسته است. اریتروسیت‌های گوسفند وقتی که به تنهایی با جزء B انکوبه می‌شوند، لیز نمی‌شوند اما با افزودن L_1 و L_2 به سرعت لیز می‌شوند. اما غلظت زیاد جزء B فعالیت L_1 در لیز اریتروسیت‌ها را مهار می‌کند. همچنین غلظت زیاد L_1 ، فعالیت جزء B را مهار می‌کند.

جزء L_2 برای لیز لازم است اما با فعالیت جزء B و L_1 تداخل ندارد. بنابراین همولیز اریتروسیت‌ها در بلاد آگار در غلظت‌هایی متناسب از L_1 و B اتفاق می‌افتد (۷۳).

ژن‌ها و تنظیم رونویسی ژن در HBL

پروتئین‌های B، L_1 و L_2 از HBL به ترتیب توسط ژن‌های hblD، hblA، و hblC کد می‌شوند. ژن‌های hblD، hblA، و hblC در یک اپرون پشت سرهم با پروموتوری در موقعیت بالا دست ژن hblC قرار دارند که به ترتیب اجزاء L_2 ، L_1 و B را کد می‌کنند. پایین دست ژن hblA، ژن hblB قرار دارد که حدوداً ۵۸ درصد همسانی با hblA در صد ۱۵۸ اسید آمینه اولیه دارد. محصول ژن hblB هنوز جداسازی نشده است. HBL برای اولین بار در سویه F837/76 شناسایی شده است. وزن مولکولی پروتئین‌های B، L_1 و L_2 به ترتیب ۵/۳۷، ۲/۳۸ و ۵/۴۳ کیلو دالتون می‌باشند. اغلب ایزوله‌ها بیشتر از یک آنتی ژن واکنش دار با آنتی بادی‌ها (علیه تک تک اجزاء HBL) را تولید می‌کنند. تنوع همولوژی هر پروتئین در سویه‌های باسیلوس سرئوس مشخص شده است. درجه بالایی از شباهت بین این همولوژی نشان می‌دهد که ژن hbl ممکن است همزمان تحت تاثیر همانند سازی یا انتقال افقی قرار بگیرد (۳۷). بیان ژن hbl توسط پروتئین‌های PlcR، ResD، Fnr، و CcpA تنظیم می‌شود. PlcR به صورت خودکار کار می‌کند و بیان اپرون HBL را با اتصال به توالی مخصوص فعال می‌کند (۸). نواحی پالیندروم PlcR-box (TATGNAN4TNCATA) در پروموتور اپران به ترتیب قرار دارند. رونویسی از ژن plcR در شروع فاز سکون آغاز می‌شود و توسط فاکتور SpoA اسپورولاسیون سرکوب می‌شود. PlcR توسط PapR (پپتید خود تحریکی که وقتی که تراکم سلولی بیشتر می‌شود درون باکتری‌ها انباشته می‌شود) فعال می‌شود، که اتصال PlcR به PlcR-box را تسهیل می‌کند (۴۲). ResD پاسخی تنظیمی از سیستم دو جزئی ResDE است که تحت شرایط بی‌هوازی و پتانسیل اکسید و احیاء پایین فعال می‌شود. ResD بیان ژن hbl را به طور مستقیم از طریق اثر متقابل با ناحیه پروموتور اپرون hbl تنظیم می‌کند و نیز ژن‌های plcR، resDE، و fnr انترتوکسین



را تنظیم می‌کند (۸،۴۳). *fnr* برای بیان کل ژن *hbl* لازم است که به مقدار اکسیژن وابسته است و کربوهیدرات را به عنوان منبع کربن استفاده می‌کند. این پروتئین بیان ژن *hbl* را از طریق توالی پروموتور *phbl* و *pplcR* فعال می‌کند (۴۴). پروتئین کاتابولیک کننده (*ccpA*) عنصر مسئول کاتابولیتی (*CRE*) به عنوان تنظیم کننده رونویسی به توالی *DNACis - binding* متصل می‌شود در فاز سکون رشد و در حضور گلوکز این پروتئین (*CcpA*) بیان ژن *hbl* را با اتصال به جایگاه *CRE* که در اپرون شناسایی شده است، مهار می‌کند. تنوع وسیعی از سیگنال‌ها و پروتئین‌ها به عنوان تنظیم کننده رونویسی *m* ژن *hbl* عمل می‌کنند. بنابراین تولید *HBL* توسط باسیلوس سرئوس شدیداً کنترل می‌شود (۷۴).

ترشح HBL

باسیلوس سرئوس‌های دارای تعداد فلاژل‌های زیادی نسبت به سلول‌های متحرک رویشی، مقدار *HBL* زیادی را ترشح می‌کنند. بنابراین هر چه تعداد فلاژل‌ها بیشتر باشد ترشح *HBL* نیز بیشتر است. همه این یافته‌ها بیانگر این موضوع هستند که فلاژل به عنوان عامل ویروانس در عفونت‌های باسیلوس سرئوس نقش دارد. در نتیجه می‌توان گفت که فلاژل باعث تسهیل اتصال به سلول میزبان، افزایش ترشح *HBL* و تمایل بیشتر به سطوح مخاطی سلول میزبان می‌شود (۷۵،۷۶). آنالیز توالی آمینو اسیدی سه پروتئین *HBL* نشان می‌دهد که هر سه جزء آن توالی پپتیدی مشخصی در اسید آمینه انتهایی دارند، بنابراین ترشح آن‌ها از طریق راه ترشحی وابسته به *S* می‌باشد (سیستم *Sec*). باکتری‌های فلاژل دار، فلاژل را از طریق سیستم *Sec* خارج می‌کنند که برای ترشح *HBL* مورد نیاز است (۳۶). کمپلکس خارج کردن فلاژل همچنین می‌تواند برای ترشح پروتئین‌های غیر فلاژلی مانند *YplA* در باکتری *یرسینیا انتروکولیتیکا* عمل کند (۸). تشابه بین ساختار بیرون برنده فلاژل با سیستم ترشحی نوع III پیشنهاد می‌کند که آن‌ها ممکن است منشا یکسانی داشته باشند که در عملکرد اشتراکی شرکت دارند (۷۷).

مسمومیت نوع اسهالی

شروع اسهال آبکی، گرفتگی عضلات شکمی و درد در

۱۵-۶ ساعت پس از مصرف غذاهای آلوده اتفاق می‌افتد. مقدار اسپور باسیلوس سرئوس خورده شده در سندرم اسهالی تقریباً ۱۰۷-۱۰۵ گرم است. همراه با اسهال، حالت تهوع هم ممکن است وجود داشته باشد، اما استفراغ خیلی کم اتفاق می‌افتد. اغلب، این علائم بیشتر از ۲۴ ساعت وجود دارند. علت مسمومیت اسهالی، تولید انتروتوکسین ناپایدار در برابر گرما و حساس به شرایط اسیدی معده است. سندرم اسهالی توسط باسیلوس سرئوسی که دارای یک یا سه انتروتوکسین اسهالی است، ایجاد می‌شود: توکسین‌های ۳ جزء همولیزین *BL* (*HBL*) و انتروتوکسین غیر همولیتیک (*NHE*)، ۲ نوع سیتوتوکسین تک جزئی *K* (*cytK-1*, *cytK-2*). اگر این توکسین‌ها از قبل غذا تشکیل شده باشند آنزیم‌های پروتئولیتیکی و *pH* اسیدی معده، این انتروتوکسین‌ها را در ناحیه روده‌ای - معده‌ای هضم می‌کنند. (۳۵ و ۱۷ و ۴).

مسمومیت نوع استفراغی

سندرم استفراغی معمولاً با غذای گیاهان گندمی (غلات) شامل برنج و کیک مرتبط می‌باشد (۱). نوع استفراغی ۶-۰/۵ ساعت بعد از مصرف غذای آلوده با حالت تهوع و استفراغ شروع می‌شود. مقدار اسپورهای باسیلوس سرئوس خورده شده در سندرم استفراغی ۱۰۸-۱۰۵ گرم است. گاهی گرفتگی عضلات شکمی و یا اسهال نیز در نوع استفراغی دیده می‌شود. مدت زمان علائم این نوع کمتر از ۲۴ ساعت است. علائم مسمومیت نوع استفراغی شبیه مسمومیت غذایی ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس است. این مسمومیت توسط توکسین دودکادپسی پپتید تولید می‌شود که در برابر گرما و شرایط اسیدی معده پایدار است. این توکسین در طی فاز سکون تولید می‌شود که احتمالاً همراه با اسپورزایی اتفاق می‌افتد (۷۸).

پیشگیری از مسمومیت غذایی

پختن کامل غذا، اغلب باعث از بین رفتن سلول‌های رویشی و اسپورها می‌شود. اما دماهای کمتر از ۱۰۰ درجه پخت ممکن است فرصت بقاء را به اسپورها بدهد. از ذخیره غیر یخچالی غذاها، خصوصاً برنج باید دوری کرد (۳۲). با جلوگیری از جوانه زنی اسپورها و جلوگیری از رشد سلول‌های رویشی در غذاهای گوشتی آماده و پخته

از بین رفتن سلول‌های رویشی و اسپورها می‌شود و اما دماهای کمتر از ۱۰۰ درجه سلسیوس ممکن است فرصت بقاء را به اسپورها بدهد. از ذخیره غیر یخچالی غذاها، خصوصاً برنج باید دوری کرد (۳۲). رشد و جوانه زنی باسیلوس سرئوس به وسیله باکتری‌های تولید کننده اسید لاکتیک و اسیدهای آلی مانند استات، فرمات و لاکتات متوقف می‌شود. در حالی که اسپورهای باسیلوس سرئوس به این اسید آلی مقاوم ترند (۲ و ۷۹).

به منظور جلوگیری و کنترل گسترش این پاتوژن احتمالاً موثر می‌باشد (۱).

از آن جا که باسیلوس سرئوس در همه محیط‌ها وجود دارد جلوگیری از آلودگی غذاها با اسپورها تقریباً غیر ممکن است. بنابراین ممانعت از جوانه زنی اسپورها و جلوگیری از رشد سلول‌های رویشی در غذاهای گوشتی آماده و پخته به منظور جلوگیری کنترل گسترش این پاتوژن احتمالاً موثر باشد. پختن کامل غذا، اغلب باعث

References

- 1-Floristean V, carman Crenu . *Carp – carae M . Bacteriological Characteristics of Bacillus cereus Isolates from Poultry . Bulletin USAMVCN .2007.64:1-2.*
- 2- Callegan . M.C. Booth . M .C Jett . B. D , Gilmore . M. S . *Pathogenesis of Grem – Positive Bacterial Endophthalmitis, Infection and Immunity , 1999.67(7), 3348-3356.*
- ۳- استاندارد ملی ایران، شمارش و شناسایی باسیلوس سرئوس در مواد غذایی، تجدید نظر دوم، چاپ پنجم ۱۳۸۵.
- 4- *Janyakhantikul.S, 2003, PCR-Based Assays for Detection of Enterotoxin Gene from Bacillus cereus. Mahidol university, 78.rt.*
- 5- *Gordon, R. E. One hundred and seven years of the Genus bacillus R. C. Berklrly, and I\I. Goodfellow (ed.). The aerobic endosporeforming bacteria. Academic Press London, 1981.*
- 6-*Ankolekar. Ch, Rahmati. T, Labbe. R. G. Detection of Toxigenic Bacillus cereus and Bacillus thuringiensis Spores in U.S Rice, International Journal of Food Microbiology, 2009,128,460—466.*
- 7-*Kalyan Kumar T. D, Murali H. S, Batra H. Y. Multiplex PCR Assay for the Detection of Enterotoxigenic Bacillus arcus Group Strains and its Application in Food Matrices. Indian J Microbiol. 2009.29: 1-7.*
- 8-*Senesi. S, Ghelardi. E, Production, Secretion and Biological Activity of Bacillus cereus Enterotoxins, Toxins, 2010, 2, 1690-1703.*
- 9-*Gordon, R. E. \V. C. Haynes, C. H.-N. Pang, The genu Bacillus. Handbook, No. 427. U.S. Department of Agriculture. Washington, D.C. 1973.*
- 10-*DelVecchio. V. G. Connolly. J. P, Alefantis. T. G, alz.A, Quan. M. A, Parra. G, Ashton. J. M, Whittington J. T, Chafin. R. D. Liang. X, Grewal. P, Khan. A. S. Mujcr. C. V, Protcornic Profilingand Identification of Irrnrunodorninant Spore Antigens of Bacillus anthraci .. Bacillus cereus, and Bacillus ihuringiensis, Applied and Environment’! Microbiology, 2006. 72(9).6355-6363.*
- 11-*Drobniewski. F. A, Bacillus cereus and Related Species, Clinical Microbiology Reviews, 1993,6(4),324-338.*
- 12-*Claus, D. R. C. W. Berkeley, The genus Bacillus. 1105-1139. P. H. A. Sneath (ed.) Bergey’s manual of systematic bacteriology, 1986 vol. 2. ·Williams and Wilkins. 1105-1139.*
- 13-*Nakamura, L. K. 1. Blumenstock, D. Claus, Taxonomic study of Bacillus coagulans Hammer 1915 with a proposal for Bacillus smithii sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 1988.38:63-73.*
- 14-*Keynan, A. N. Sandler, Spore Research in Historical Perspective. 1-48. A.Hurst and G. \V. Gould (ed.) The Bacterial Spore, Academic Press. New York , 1983. Vol1. 2. 678-687.*
- 15-*Sagripanti. J. L, Carrera. M, Insalaco. J, Ziemski. M, Rogers. J, Zandomeni. R. Virulent Spores of Bacillus anthracis and other Bacillus species Deposited on Solid Surfaces have Similar Sensitivity to Chemical Decontaminants, Journal of Applied Microbiology, 2006, 102, 11-21.*
- 16-*Henriques. A. 0, Moran. C. P, Structure, Assembly. and Function of the Spore SurfaceLayers, Annu Rev Microbial, 2007. 61.555-588.*
- 17-*Dworkin. Marlin, Falkow. Stanley, the Prokaryotes A Handbook on the Biology of Bacteria. Printed in Singapore. ‘2006. Volume 4,580-592.*



- 18-Setlow, P. Germination and Outgrowth, A.Hurst, and G. W. Gould (ed.) *The Bacterial Spore*, Academic Press. London, 1983, vol. 2, 211-254.
- 19-Gould, G. W. Mechanisms of Resistance and Dormancy, A. Hurst and G. W. Gould (ed.) *The Bacterial Spore*, Academic Press. New York. 1983, vol 2, 173-209.
- 20- Yousten AA. Germination of *Bacillus cereus* Endospores: A Proposed Role for Heat Shock and Nucleosides, 1975. 21 (8), 1192-1197.
- 21-Hornstra. L. M. de Leeuw. P. L. A, Moezelaar. R, Wolbert. E. J, de Vries. Y. P, de Vos. W. M, Abee. T, Germination of *Bacillus cereus* Spores Adhered to Stainless Steel, *International Journal of Food Microbiology*, 2007, 116, 367-371.
- 22-Sleytr, U. B. P. Messner. Crystalline Surface Layers in Prokaryotes. *J. Bacteriol* 1988.] 70:2891-2897.
- 23-Ticknor. L. O. Kolsto. A. B, Hil. K. K, Keim. P, Laker. M. T, Tonks. M, Jackson. P. J, Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis of Norwegian *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* Soil Isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001. 67(10),4863-4873.
- 24-Cassidy R. R. B. J. Kolodziej. Isolation and Characterization and Utilization of Polysaccharide from *Bacillus megaterium* ATCC 19213. *J.Gen. Microbiol* 1984. 130:535-539.
- 25-Severin.A, Tabei. K, Tomasz. A, The Structure of the Cell Wall Peptidoglycan of *Bacillus cereus* RSVF1, a Strain Closely Related to *Bacillus anthracis*, *Microbial Drug Resistance*, 2004, 10(2),77-82.
- 26-Minnikin, D. E. M. Goodfellow,. Lipids in the Classification of *Bacillus* and Related Taxa. Berkeley, R. C. and M. Goodfellow (ed.) *The Aerobic Endosporeforming Bacteria*. Academic Press. London, 1981. 59-103.
- 27-Lake. R, Hudson. A. Cressey. P, 2004, Risk Profile: *Bacillus* SPP. In Rice, Institute of Environmental Science & Research Limited.
- 28-Stenfors Arnesen. L. P, Fagerlund. A, Granum. P. E, From Soil to Gut: *Bacillus cereus* and its Food Poisoning Toxins, *FEMS Microbiol Rev*, 2008, 32, 579-606.
- 29-Jensen.G. B, Hansen. B. M, Eilenberg. J, Mahillon. J, The Hidden Life Styles of *Bacillus cereus* and Relatives, *Environmental Microbiology*, 2003,5(8), 631-640.
- 30-Margulis. L, Jorgensen. J. Z, Dolan. S, Koichinsy. R, Rainey. F. A, Lo. SH. CH, The Arthromitis Stage of *Bacillus cereus*: Intestinal Symbionts of Animals, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998.95.1236-1241.
- 31-Swiecicka. I, Mahillon. J, Diversity of Commensal *Bacillus cereus* sensu lato Isolated from the Common Soil Bug (*Porcillo. cab r. Isopoda*), *FEMS Microbiol Ecol*, 2006,56, 132-140.
- 32-Santis.E.P.L,Foddai.A, Toxin gene Pattern in *Bacillus cereus* group strains isolated from cheep ricotta cheese, *Vet res common*, 2008,32(suppl 1):S323- 5326.
- 33- Wong. H. CH, 2009, *bacillus cereus*, Soochow University.
- 34-Thompson. N. E, Ketterhagen. M. J, Bergdoll. M. S, Schantz. E. J, Isolation and Some Properties of an Enterotoxin produced by *Bacillus cereus*, 1984, 43(3), 887-894.
- 35-Beecher. D. J, Macmillan. J. D. Characterization of the Components of Hemolysin BL from *Bacillus cereus*, *Infection and Immunity*. 1991, 59(5), 1778-1784.
- 36-Beecher. D. J, Schocn1. J. Lee Wong. . C. Enterotoxigenic Activity of Hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Infection and Immunity*, 1995, 63(11). 4423-4428.
- 37-Ghelardi. E, Celandroni. F, Salvetti. S, Ceragioli. M, Beecher. D. J, Senesi. S, L. Wong. A. C. Swarming Behavior of and Hemolysin BL Secretion by *Bacillus cereus*, *Applied and Environmental Microbiology*, 2007,73(12),4089-4093.
- 38-Beecher. D. J, L. Wong. A. C, Tripartite Hemolysin BL from *Bacillus cereus*, *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272 (1), 233-239.
- 39-Madegowda. M, Eswaramoorthy. S, Burley. S. K, Swaminathan. S, XRay Crystal Structure of the B Component of Hemolysin BL from *Bacillus cereus*, *proteins Structure Function Bioinformatics*, 2008, 71, 534-540.
- 40-Schoeni. I. L, rVong. A. C, Heterogeneity Observed in the Components of Hemolysin BL, an Enterotoxin Produced by *Bacillus cereus*, *Int. J. Food Microbiol*. 1999,53, 159-167.



- 41-Beecher, D.J.; Wong. A.C. Tripartite Haemolysin BL: Isolation and Characterization of Two Distinct Homologous Sets of Components from a Single *Bacillus cereus* Isolate, *Microbiology*, 2000, 146, 1371- 1380.
- 42-Agaisse. H, Gominet. M, Okstad. O. A, Kolsto. A. B, Lereclus. D. *P1cR* is a Pleiotropic Regulator of Extracellular Virulence Factor Gene Expression in *Bacillus thuringiensis*, *Mol. Microbiol*, 1999, 32, 1043- 1053.
- 43-Duport. C Zigha. A. Rosenfeld. E, Schmitt. P. Control of Enterotoxin Gene Expression in *Bacillus cereus* F4430173 resolves the Redox-Sensitive ResDE Signal Transduction System. *J. Bacteriol.* 2006, 188, 6640-6651.
- 44-van der Voort. M. Kuipers. O. P, Buist. G, de Vos. W. M, Abee. T, Assessment of CcpA-Mediated Catabolite Control of Gene Expression in *Bacillus cereus* ATCC 14579, *BMC Microbiol*, 2008, 8, 62.
- 45-Hueck. C. J, Type III Protein Secretion Systems in Bacterial Pathogens of Animals and Plants. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1998, 62, 379-433.
- 46-Ghelardi. E, Celandroni. F. Salvetti. S, Beecher. D. J, Gominet. M, Lereclus. D, Wong. A. C. Senesi. S, Requirement of *tlhA* for Swarming Differentiation, Flagellin Export. and Secretion of Virulence-Associated Proteins in *Bacillus thuringiensis*, *J. Bacteriol*, 2002, 184, 6424-6433.
- 47-Salvetti. S, Ghelardi. E. Celandroni. F, Ceragioli. M, Giannesi. F, Senesi. S, FlhF, a Signal Recognition Particle-Like GTPase, is Involved in the Regulation of Flagellar Arrangement, Motility Behaviour and Protein Secretion in *Bacillus cereus*. *Microbiology*, 2007, 153, 2541-2552.
- 48-Lindback. T. Fagcllund. A, Rodland. M. S. Granum. P. E, Characterization of the *Bacillus cereus* Nhe enterotoxin. *Microbiology*, 2004. *ISO*, 3959-3967.
- 49-Fagerlund. A. Lindback. T. Storset. A. K. Granum. P. E. Hardy. S. P. *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*, 2008, 154, 693-704.
- 50-Granum. P. E, Sullivan. K, Lund. T, The Sequence of the NonHaemolytic Enterotoxin Operon from *Bacillus cereus*, *FEMS Microbiology Letters*, 1999, 177, 225-229.
- 51-Gohar. M, Faegri. K, Perch at. S, Ravnum. S, Okstad. O. A, Gominet. M, Kolsto. A. B, Lereclus. D. The *P1eR* Virulence Regulon of *Bacillus cereus*. *PLoS ONE*, 2008, 3(7), 1-9.
- 52-Zigha. A, Rosenfeld. E, Schmitt. Ph, Duport. C, The Redox Regulator *Fnr* Is Required for Fermentative Growth and Enterotoxin Synthesis in *Bacillus cereus* F4430/73, *Journal of Bacteriology*. 2007. 189(7), 2813-2824.
- 53-Messaoudi. K, Clavel. T, Schmitt. Ph, Duport. C, *Fnr* Mediates Carbohydrate-Dependent Regulation of Catabolic and Enterotoxin Genes in *Bacillus cereus* F4430/73, *Research in Microbiology*, 2010, 161, 30-39.
- 54-Fagerlund. A, Ween. O, Lund. T, Hardy. S. P, Granum. P. E, Genetic and functional analysis of the *cytK* family of genes in *Bacillus cereus*, *Microbiology*. 2004. 150(8), 2689-2697.
- 55-Lund. T, De Buyser. M. L, Granum. P. E. A new *Cytotoxin* from *Bacillus cereus* that may Cause Necrotic Enteritis, *Molecular Microbiology*, 2000. 38(2). 254-261.
- 56-Ngamwongsatit. P, Buasri. W, Pianariyanon. P, Pulsrikarn. C, Ohba. M, Assavanig. A, Panbangred. W, Broad Distribution of Enterotoxin Genes (*hblCDA*, *nheABC*, *cytK*, and *entFM*) Among *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* as Shown by Novel Primers. *Int. J. Food Microbiol*, 2008, 121, 352-356.
- 57-Choma. C, Granum. P. E, The Enterotoxin T (BeET) from *Bacillus cereus* Can Probably not Contribute to Food Poisoning, *FEMS Microbiology Letters*, 2005, 217, 115-119.
- 58-Agata. N, Ohta. M, Mori. M, Isobe. M, A Novel Dodecadepsipeptide, Cereulide, is an Emetic Toxin of *Bacillus cereus*, *FEMS Microbiol Lett.* 1995, 129(1), 17-20.
- 59-Andersson. M. A, Hakulinen. P, Honkalaampi-Hamalainen. U, Hoornstra. D, Lhuguenot. J. C, Maki-Paakkancn. J, Savolainen. M, Severin. I, Starnmati. A. L, Turco. L, Weber. A, Wright. A. V, Zucco. F, Salkinoja-Salonen. M, Toxicological Profile of Cereulide, the *Bacillus cereus* Emetic Toxin, in Functional Assays with Human, Animal and Bacterial Cells, *Toxicol*, 2007, 49, 351-367.
- 60-Apetroaie-Constantin. G, Shaheen. R, Andrup. L, Smidt. L, Rita. H, Salkinoja-Salonen. M, Environment Driven Cereulide Production by Emetic Strains of *Bacillus cereus*, *International Journal of Food Microbiology*, 2008, 127, 60-67.



61-Haggbloom. M. M, Apetroaie. C. Ander “;’on .. L A. ~ Ikinaja-Salonen ..!VI. S, Quantitative Analysis of Cereulide, the Emeti T in r Bacillus cereus, Produced under Various Conditions, Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(5), 2479-2483.

62-Beattie. S. H, Williams. A. G, Detection of Toxigenic Strain of Bacillus cereus and other Bacillus spp. With an improved Cytotoxicity, Letters in Applied microbiology, 1999, 28, 221-225.

63-Arnesen L.P.S, Fagerlund A, Granum P.E. From soil to gut: Bacillus cereus and its Food Poisoning Toxins. FEMS Microbiol Rev. 2008. 32: 579606.

64-Johnson. K. M, Bacillus cereus Foodborne Illness-van Update, 1. Food Prot, 1984,47,145-153.

65-Veld. P. H, Ritmeester. W. S, Delfgou-van Asch. E. H. M, Dufrenne. J. B, Wernars. K, Smit. E, Leusden. F. .M. V, Detection of Genes Encoding for Enterotoxins and Determination of the Production of Enterotoxins by HBL Blood Plates and Immunoassays of Psychrotrophic Strains of Bacillus cereus Isolated from Pasteurised Milk, International Journal of Food Microbiology, 2001,64,63-70.

66-Phelps. R. J, McKillip. J. L, Enterotoxin Production in Natural Isolates of Bacillaceae outside the Bacillus cereus Group, Applied and Environmental Microbiology, 2002. 68(6), 3147-3151.

67-Thaenthanee. S, Lee wong. A. C, Panbangred. , Phenotypic and Genotypic Comparisons a Broad Distribution and Heterogeneity of Hemolysin BL Gene among Bacillus cereus Isolate International Journal of Food Microbiology, 2005, 105,203-212.

68-Rusul. G, Yaacob. NH, Prevalence of Bacillus cereus in selected foods and detection of enterotoxin using TECRA- VIA and BCET-RPLA, Int J Food Microbiol. 1995, 25(2), 131 -139.

69-McKillip. J. L, Prevalence and Expression of Enterotoxins in Bacillus cereus and other Bacillus spp., a Literature Review, Antonie van Leeuwenhoek.2000,77,393-399.

70-Ehling-Schulz. M, Fricker. M, Scherer. S, Bacillus cereus, the Causative Agent of an Emetic Type of Food-Borne Illness, Mol. Nutr. Food Res, 2004, 48,479 - 487.

71-Kotiranta. A, Lounatmaa. K, Haapasalo. M, Epidemiology and Pathogenesis of Bacillus cereus Infections, Microbes and Infection, 2000, 2, 189-198.

72-Wijnands. L. M, Dufrenne. J. B, Zwietering. M. H, van Lensden. F. M, Spores from Mesophilic Bacillus cereus Strains Germinate Better and Grow Faster in Simulated Gastro-Intestinal Conditions than Spores from Psychrotrophic Strains, International Journal of Food Microbiology, 2006, 112, 120-128.

73-Hoffmaster. A. R, Hill. K. K, Gee. J. E, Marston. C. K, De. B. K, Popovic. T, Sue. D, Wilkins. P. P, Avashia. S. B, Drumgoole. R, Helma. C. H, Ticknor. L. O, Okinaka. R. T, Jackson. P. J, Characterization of Bacillus cereus Isolates Associated with Fatal Pneumonias: Strains are Closely Related to Bacillus anthracis and Harbor B. anthracis Virulence Genes. J. Clin. Microbiol, 2006, 44, 3352-3360.

74-Gaur. A. H, Patrick. Ch. C, McCullers. J. A, Flynn. P. M, Pearson. T. A, Razzouk. B. I, Thompson. S. J, Shenep. J. L. Bacillus cereus Bacteremia and Meningitis in Immunocompromised Children. 2001, 32,1456-1462.

75-Blakey. L. J, Prlest. F. G, The Occurrence of Bacillus cereus in some Dried Foods Including Pulses and Cereals, Jomul of Applied Bacteriology, 1980,48, 291 -302.

76-Jaquette. C. B, Beuchat. L. R. Survival and Growth of Psychrotrophic Bacillus cereus in Dry and Reconstituted Infant Rice Cereal, 1998, 62(12). 1629-1635.

77-Penna. T. C. V, Moraes. D. A. The Influence of . isin on the Thermal Resistance of Bacillus cereus. Journal of Food Protection. 2002. 65. 415-418.

78-Chang Y.H, Shangkuan Y.H, Lin H.Ch, Liu H.W. PCR Assay of the groEL Gene for Detection and Differentiation of Bacillus cereus Group Cells. Applied and Environmental Microbiology. 2003. 69:8,4502-4510.

79-Konemanw. Allen. Stephan D, Color atlas and text book of diagnostic microbiology, Fifth Philadelphia New York, 2002;13:171-241.