

مرواری به ساختار ویرولانس باسیلوس سرئوس

دکتر حسن حسین زادگان

دانشیار باکتری شناسی، گروه علوم پایه، دانشکده علوم پزشکی و
مراغه، مراغه، ایران

شبیم مولایی کهنه شهری

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

جواید تقی نژاد

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

j_taghinejad@yahoo.com

نیز رفتار می‌کند (۳).

باسیلوس سرئوس در گیاهان و مواد غذایی می‌تواند رشد کند، همچنین سازگاری خوبی برای رشد دوره‌های 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) انتروتوكسین اسهالی نایپایدار در برابر گرما که هنگام گرم شدن غذا تخریب می‌شود (۲) توکسین استفراغی پایدار در برابر گرما که با گرم شدن غذا غیرفعال نمی‌شود. انتروتوكسین‌های نایپایدار در برابر گرما از طریق مواد غذایی خام منتقل می‌شوند (۴ و ۷).

شیوع بیماری‌های غذایی در سال‌های اخیر علی رغم 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

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 انتروتوكسین‌های همولیزین HBL، غیر همولیتیک NHE و سیتوتوكسین 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، هوایی 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 اسپورانزیوم قرار دارد. این باکتری متحرک، دارای فلاژل‌های پیرامونی، هوایی - بی هوایی 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 بیماری زای فرصت طلب انسانی





در مسمومیت‌های غذایی ارائه شده است (۱۱). جنس باسیلوس گروهی بزرگ و متنوع از خانواده باسیلاس است که دارای باسیل‌های گرم مثبت بزرگی هستند که هوایی-بی هوایی 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 بهبقاء 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). برخلاف اغلب جنس‌های باکتریایی، یکی از خصوصیات منحصر به فرد این جنس، محدوده بسیار وسیع گوانین و سیتوزون مولکول DNA در گونه‌های متفاوت (۳۲-۶۲ درصد مول) می‌باشد. این ویژگی نشان‌دهنده ناهمگونی بسیار شدید ارگانیسم درون جنس می‌باشد (۱۳).

باسیلوس سرئوس

این باکتری باسیل گرم مثبت، با اندازه $3-4 \times 1$ میکرومتر اسپوردار و هوایی-بی هوایی اختیاری از خانواده باسیلاس است. این باکتری متحرک، همولیتیک فعال، کاتالاز مثبت، مقاوم به پنی سیلین، مانیتول منفی، فاقد رشد ریزوئید و حاوی سیستم فسفو لیپازی (لیپیتیاز)، و مزوپیل می‌باشد. دمای مناسب رشد این باکتری $30-35$ درجه سلسیوس است. pH مناسب برای رشد آن $4/9$ تا $9/3$ 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).

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 ارگانیسم و تولید توکسین ایجاد می‌شود و باعث آلودگی پنیرهای پاستوریزه و محلی می‌شود (۴۰).

باسیلوس سرئوس مسئول دو نوع متفاوت از مسمومیت‌های غذایی است: اسهالی و استفراغی. بیماری اسهالی داری دوره کمون ۸-۱۶ ساعت است و دردهای شکمی و اسهال مشخص ایجاد می‌شود. این بیماری توسط انتروتوكسین‌ها ایجاد می‌شود که در طی رشد و رویش باسیلوس سرئوس در روده کوچک ایجاد می‌شود. نوع دیگر بیماری، استفراغی است که دارای دوره کمون $5-50$ 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 10^4-10^8 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، باکتریومی، سپتی سمی، اندوکاردیت، پنو مونی، منژیت، گاستریت و عفونت‌های پوستی می‌باشد (۱۱ 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 سوموم 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

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 سوبتیلیس توسط ارنبرگ جزء اولین باکتری‌هایی بود که شناسایی شد و کن در سال ۱۸۷۲ آن را به باسیلوس سوبتیلیس تغییر نام داد (۲۴). باسیلوس سرئوس ۱۵ سال بعد از کشف باسیلوس سوبتیلیس، در سال ۱۸۸۷ در یک گاوداری توسط فرانکن 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 ارگانیسم آلوده کننده غذا افزایش یافت. باسیلوس سرئوس در سال ۱۹۶۹ از بیمار مرده مبتلا به ذات الایه، از نمونه خون و مایع پرده جنب جدا شد (۲۵). گوردن و همکارانش در سال ۱۹۸۱ بسیاری از روش‌های مهم تشخیصی با سیلوس‌ها را طبقه‌بندی شده ارائه دادند. طبقه‌بندی ارائه شده روش سریعی بود، چون بر حسب دو خصوصیت رشد هوایی و تشکیل اسپور انجام شده بود (۲۶). رده‌بندی با تنوع ظاهری و با خصوصیات فنوتیپی (اندازه مخصوص و موقعیت اندوسپور در داخل سلول رویشی) و تغذیه، خصوصیات رشد و سوبیستراهاي 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، گرم‌دوست و به همین ترتیب گونه‌های قلیا دوست، خشی 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 الکل، آنزیم‌ها و ویتامین‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند اهمیت دارند (۲۷).

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 لوسين 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 پروفیوتیک، برای حیوانات مفید واقع شوند. این باکتری انتروتوکسین، همولیزین و لستیتیاز C ترشح می‌کند که در بیماری زایی و تشخیص آن مهم است (۱۹، ۱۸). مقایسه 16srRNA ۱۶ نشان می‌دهد که باسیلوس سرئوس بیشتر با باسیلوس آنتراسیس، عامل آنتراسیس (سیاه زخم) و باسیلوس تورنجینسیس، پاتوژن حشرات ارتباط دارد. اگرچه این باسیلوس‌ها خصوصیات مشابهی دارند ولی از باسیلوس سرئوس قابل تشخیص هستند و این اختلافات در جدول زیر ذکر شده اند (۲۲).

طبقه‌بندی 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 میکوپلیز 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*

اسپور

اسپورهای 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 اگزوسپوریم می‌باشند. هسته درونی دارای آمینه mRNA و tRNA و تعدادی آنزیم می‌باشد. اسیدهای آمینه به صورت پروتئین‌های سیتو پلاسمی با وزن مولکولی کمی از کروموزوم، فاقد mRNA، دارای مقادیر اندکی tRNA و تعدادی آنزیم می‌باشد. اسیدهای آمینه به صورت پروتئین‌های سیتو پلاسمی با وزن مولکولی پایین تحت عنوان پروتئین‌های اسیدی کوچک محلول (SASPs) ذخیره شده اند (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 (۴۰ و ۴۱).

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 پیتید کوچک متصل شونده به باکتری چهار فقر غذایی و مواد سیگنان آغازین اسپورزایی است امکان پذیر می‌شود. مرحله آخر باکتری باید در فاز ساکن قرار گیرد.

فرآیند آغازین به تقسیم غیر متفاوت 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).

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 اسپورانژیم 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. مهم ترین مساله، وجود اسید دی پیکو لینک (DPA) در کورتکس، است که از بیوسنتز لیزین حاصل می‌شود. DPA که شلاله کننده کلیسم بوده و در کورتکس، کلیسم 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



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 گلایسین، اسید آمینه‌های طبیعی دیگر و ریبوزیدهای پورین، جوانه زنی را کاهش می‌دهند. جوانه زنی اسپور باسیلوس سرئوس سرئوس توسط چندین مهار کننده آنژیم شبه تریپسین، رخ نمی‌دهد (لوپیتین، آنتی پین، توسلیل لیزین کلرومتیل کتون). L-آلائین 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-آلائین را که خود یک نوع پروتئاز است فعال نماید. مرحله دوم که مرحله آغازین نام دارد، در اثر مواجهه گیرنده فعال شده با L-آلائین 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 رفت، همچنین دی پیکولینیک اسید و Ca^{2+} در محیط رها می‌شوند، توانایی جذب رنگ در اسپورها افزایش می‌یابد و اسپورها از نظر متابولیکی فعال می‌شوند. در این زمان، مرحله سوم به نام رشد به خارج آغاز می‌شود. این مرحله موجب برگشت اسپور به حالت رویشی می‌شود (۳۶). آنژیم هایی مانند تریپسین ممکن است، در مکانیسم شکستن دوره نهفته‌گی اسپور باکتری باسیلوس سرئوس شرکت داشته باشد. جوانه زدن اسپور باسیلوس سرئوس ممکن است به طور نسبی توسط چندین ممانعت کننده جلوگیری شود، همانند

آنژیم‌های شبیه تریپسین از جمله: لیزین، کتون، لئوپین و کلرامفینیکل همچنین سستر مصنوعی از آنژیم تریپسین نیز باعث مهار جوانه زنی اسپور باسیلوس سرئوس می‌شود. عصاره خامی که از جوانه زدن اسپور باسیلوس سرئوس تولید می‌شود حاوی آنژیم شبیه تریپسین می‌باشد که دارای فعالیت حساس به ترکیبات بازدارنده جوانه زنی مانند لوپیتین، 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 ۱۰-۳۰٪ از محتوی دی‌پیکولینیک اسید خود را از دست می‌دهند. در حین جوانه زنی اسپور قطعاتی از ۵ کتو فرین (گلیکو پروتئین متعلق 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). نیترات‌تولید 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 ۴۶ 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 (۸۰-۹۰ درجه سیلسیوس) 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، کلرامفینیکل 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

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

کپسول

کپسول یک لایه پلی ساکاریدی یا پپتیدی 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 عابی گویند. این ساختارها برای بقا باکتری ضروری نیستند. کپسول باکتری‌های پاتوژن مانع بلع و کشته شدن باکتری توسط فاگوستیت‌ها می‌شوند. کپسول در باسیلوس آنتراسیس به عنوان فاکتور ویرولانس می‌باشد که یک هموپلی پپتید دی گلوتامیک اسید است. باسیلوس سرئوس کپسول کربوهیدراتی تولید می‌کند (۴۶).

فلازل

بعضی گونه‌های باکتری‌ها متحرک و دارای اندامک‌های حرکتی به نام فلازل بوده که از واحدهای تکرار شونده به نام فلازلین تشکیل یافته است. فلازل‌ها درون غشای سیتوپلاسمی قرار گرفته اند 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 فلازل‌های 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 فلازلی 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 فلازل هستند (۴۷).

۱۵ درجه سلسیوس در برج 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 زن Gerl و GerQ به عنوان گیرنده‌های رویش، جهت جوانه زنی نیاز دارد. در حقیقت گیرنده GerL با همکاری Gerl عهده دار بیشتر پاسخ‌ها به L-آلانین برای جوانه زدن منحصر به فرد اسپور می‌باشد ولی سهم Gerl کمتر از گیرنده Gerl 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 زن GertT تحت شرایط قلیایی، کارآبی 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 انترو توکسیژنیک باسیلوس سرئوس در سلول‌های Caco₂ اتفاق می‌افتد که این تحريك 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 بیماری زا دارای لایه‌های سطحی گلیکوپروتئینی به نام لایه S روی پپتیدو 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 میزان، ممانعت از ورود



دیواره سلول

در باسیلوس سرئوس پروتئین‌های پلی ساکاریدی درصد از دیواره سلولی را تشکیل می‌دهند و شامل یک پلی ساکارید خشی مرکب از N استیل گلوکز آمین، N استیل گالاكتوز آمین و گلوکز با نسبت ۴:۱:۱ می‌باشد.

تقریباً دیواره سلولی تمام گونه‌های باسیلوس مشکل از پپتیدوگان مزو- دی آمینوپاپیمیلیک است. عملکرد پپتیدوگلیکان در برقراری شکل سلول است. مشخصه اسیدی دیواره سلولی در باسیلوس سرئوس داشتن واحدهای تکراری تراساکاریدی است. اتصالات عرضی بین موروبپتیدها دایمرها هستند و تعدادی از موروبپتیدها 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 درصد از دیواره سلولی را تشکیل می‌دهد. نوع این پلی‌مراها غیر یونی به میزان فسفات و منیزیم محیط کشت بستگی دارد.

غشاء

غشاء سیتوپلاسمی دارای سه قسمت بوده که از پروتئین (۶۰-۷۰ درصد)، لیپید و فسفولیپید (۲۰-۳۰ 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 بقاء باسیلوس سرئوس

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

دما

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

سلسیوس و بعضی دیگر در دمایی کمتر از ۴-۵ درجه سلسیوس رشد می‌کنند. محدوده دمایی رشد باسیلوس سرئوس ۷-۴۹ درجه سلسیوس است. سلول‌های رویشی با حرارت از بین می‌روند اما اسپورها مقاوم به گرمای هستند. دمای جوانه زنی اسپور ۸-۳۰ درجه سلسیوس است. مقاومت به گرمای در غذاهای روغنی و چرب و همچنین در غذاهایی با رطوبت کم، افزایش می‌یابد. اسپورها در گرمای خشک بیشتر از گرمای مطروب مقاوم هستند. توکسین استفراغی به شدت به گرمای 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 $\frac{9}{3}$ و $\frac{4}{3}$ می‌باشد. رشد باکتری در حضور $\frac{1}{10}$ درصد اسید سولفوریک مهار می‌شود (۵۱).

اکسیژن

باسیلوس سرئوس در حضور و غیاب اکسیژن به خوبی رشد می‌کند. ولی تولید توکسین در شرایط بی‌هوایی 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 $0.912-0.950$ است. اسپورها برای مدت طولانی در غذاهای خشک شده باقی می‌مانند (۵۲).

اکولوژی باسیلوس سرئوس

سویه‌های باسیلوس سرئوس اکثرا 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 بقاء 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

a توکسین کلستریدیوم 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 متالپروتئین کوچک به وزن مولکولی ۲۳۰۰۰ دالتون است که دارای دو اتم روی (Zn²⁺) است. اسفنگومیلیناز، پروتئینی با وزن مولکولی بین ۴۱۰۰۰ تا ۲۳۳۰۰ دالتون است که برای فعالیت به کاتیون‌های دو ظرفیتی نیازمند است (۶۱).

سرولیزین

سرولیزین، سیتوولیزین وابسته به کلسترول است که شامل دو باقی مانده اسید آمینه سیستئین است. در غیاب دی تریوتیریtol، اکسایش خود به خودی در شکل گیری فرم اکسید شده توکسین حاصل می‌شود. بنابراین سروولیزین، با تیول فعال می‌شود که شبیه استرپتولیزین استرپتوكوکوس پیوژنر، پنومولیزین استرپتوكوکوس پنومونیا و لیستریولیزین لیستریا مونوسایتوژنر می‌باشد. سروولیزین به وسیله عوامل احیاء کننده تیول مانند سیستئین، -۲-مرکاپتوتانول، دی تیوکربتول و سدیم تیو گلیکولات فعال می‌شود و به وسیله استرول ها، 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 (۱۹۰-۶۷) می‌باشند سروولیزین به عنوان همولیزین I نیز شناخته می‌شود. وزن مولکولی سروولیزین ۵۵ کیلو دالتون است و ظاهرا نقشی در بروز علائم التهاب معده‌ای - روده‌ای ناشی از مصرف مواد غذایی ندارد (۶۲).

توکسین غیرهمولیتیک (Nhe)

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

و نیز رشد گیاهان را افزایش می‌دهد (۲۹). این باکتری مولد آنتی بیوتیک‌های آزوپرتمایسین A و کانوزامن است. این آنتی بیوتیک‌ها رشد پاتوژن‌های گیاهی، اوومیست‌ها (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 و حشی 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 ویرولانس

باسیلوس سرئوس‌ها تعداد زیادی از آنزیم‌ها و سیتوتوکسین‌ها را تولید می‌کنند که در مسمومیت‌های اسهالی دخالت دارند. سه سیتوتوکسین Hbl (همولیزن 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 شده اند که احتمالاً در مسمومیت اسهالی باسیلوس سرئوس دخالت دارند. این توکسین‌ها شامل سروولیزین O، همولیزین A2, Inh II, Inh A2 هستند (۶۰).

فسفولیپاز و اسفنگومیلیناز

فسفولیپاز تولید شده توسط باسیلوس سرئوس، مشابه



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 hbl و nhe ظاهرا همانند هستند، اما آنالیز موتانت‌های ناقص در ژن‌های fnr و ccpA، اثرات متفاوتی را روی بیان و ترشح این توکسین‌ها نشان می‌دهند. در باسیلوس سرئوپس‌های HBL موتانت در ژن fnr ترشح Nhe نسبت به ترشح fnr 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).

NHE ترشح

وجود توالی‌های پیتیدی مشخص در سه جزء پروتئین Nhe پیشنهاد می‌کند که ترشح آن‌ها از طریق سیستم Sec رخ می‌دهد. ترشح Nhe در باسیلوس سرئوپس تحت تاثیر FlhF قرار می‌گیرد. FlhF سیگنال شناسایی ذرات پروتئینی است که همولوژی بالایی با پروتئین‌های Ffh و FtsY (برای ابناشتنگی خارج سلولی پروتئین در اشریشیاکلی و باسیلوس سوبتیلیس ضروری هستند) دارد. باسیلوس سرئوپس 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 سرئوپس، 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).

سیتو توکسین K

سیتو توکسین K پروتئینی ۳۴ کیلو دالتونی است و همولیز IV نیز نامیده می‌شود. این توکسین، فعالیت سیتو توکسیکی شدیدی در برابر سلول‌های Vero دارد. این توکسین سبب سوراخ گردیدن لبید 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

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

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

ژن‌های و تنظیم رونویسی ژن NHE

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



مثبت، روی سلول‌های Vero اثری خنثی دارد که این موضوع نشانگر عدم دخالت توکسین T در مسمومیت‌های غذایی است (۵۷). انتروتوكسین T قادر به ایجاد تجمع مایع در حلقه‌های دوازده روده خرگوش می‌باشد و نفوذ پذیری عروقی پوست خوکچه 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 پیتید 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) (NRPS) می‌باشد که توسط پیتید سنتاز غیر ریبوزمی (NRPS) می‌باشد که توسط ژن NRPS رونویسی می‌شود. ساختار سرئولید حلقه‌ای شبیه والینومایسین تولید شده توسط سویه‌های استرپتوپومایسین است. سرئولید 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 (۶۰). 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. سندروم 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 ۲۴Kbp، روی پلاسمید بزرگ ۲۰۰ Kbp قرار دارد (۶۰). سرئولید به گیرنده‌های 5-HT3 متصل می‌شود و تحريك عصب واگ آوران را افزایش می‌دهد. بنابراین سرئولید باعث بروز تهوع و استفراغ می‌شود. این اثر سرئولید باعث نقص کبد می‌شود. تزریق درون صفاتی با دوز بالا از سرئولید سنتز شده، اختلال زیادی در

تخريب سلول‌های اپی تلیال می‌شود. یک سیتو توکسین (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 همولتیک می‌باشد. توالی اسید آمینه‌های سیتو توکسین K شباهت‌هایی به لوکوسیدین‌ها، گاما همولیزین، آلفا همولیزین استافیلوكوکوس اورئوس و بتا توکسین کلستریدیوم پرفرینجنس و همولیزین باسیلوس سرئوس دارد. همه توکسین‌های نام برد به خانواده توکسین‌های تشکیل دهنده منفذ (β -barrel) تعلق دارند. سیتو توکسین K فعالیت انتروتوكسیکی علیه سلول‌های اپی تلیال روده‌ای و همچنین توانایی تشکیل منفاذ، در لیپید دو لایه را دارد. سیتو توکسین 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 cytK1 به اندازه سویه NVH391/98 خاصیت توکسیکی ندارند و این موضوع نشان می‌دهد موضوع تنوع فعالیت سیتو توکسیکی در ارتباط با تنوع در سطوح بیان ژن است (۵۳). سیتو توکسین K توسط ژن cytK بیان این ژن توسط PlcR از طریق پیوندش با cytK در توالی پرموتور 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).

انتروتوكسین T

انتروتوكسین T یک انتروتوكسین با یک زیر واحد می‌باشد که دارای یک واحد توکسینی ۴ کیلو دالتونی NHE.HBL مشابه است و از نظر فعالیت بیولوژیکی مشابه است. 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



که سم اسهالی باعث بیماری شود بسیار پایین است، چون این انتروتوكسین در دستگاه گوارش تخریب می‌شود و همچنین تعداد سلول‌های موردنیاز برای تولید مقدار قابل توجهی از توکسین در غذا بسیار بیشتر از تعداد سلول‌های موردنیاز 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 محيط کشت معمولاً با هیدرولیز کربوهیدرات‌ها کاهش یافته و در نتیجه تجزیه پروتئین‌ها افزایش می‌یابد. وقتی که pH محيط به کمترین مقدار برسد، مقدار بهینه انتروتوكسین تولید می‌شود (۶۹). این توکسین سه جزئی فعالیت همولیز، سیتولیز، درمونکروز، نفوذپذیری رگی و انتروتوكسیک را نشان می‌دهد و عامل حدود ۵۰ درصد از مسمومیت سلول‌های چشمی توسط عصاره سانتریفیوژ شده باسیلوس سرئوسی در عارضه اندوفتالمیتیس می‌باشد. تزریق خوراکی این انتروتوكسین در میمون‌های رسوس، باعث اسهال می‌شود (۴۰). HBL توسط آزمایش‌های وسترن بلاط و انتشار اینمنی خالص می‌شود (۷۰).

Sاختار و فعالیت بیولوژیکی HBL

همولیزین BL یک سیستم لیز غشایی مرکب از ۳ پروتئین مجرای آتنی β , α_1 و α_2 است. این پروتئین‌ها به طور مستقل ترشح می‌شوند و هر سه برای حداقل فعالیت بیولوژیکی این توکسین ضروری هستند. تاکنون فعالیت توکسیکی شناسایی شده برای HBL شامل درمونکروتیک، سیتوتوكسیک، همولیز، نفوذپذیری عروق، نکروز و التهاب چشمی می‌باشد، توکسین HBL باعث تجمع مایع در لوپ‌های ایلیال گره زده خرگوش می‌شود که یک تست قطعی برای آشکار شدن فعالیت انتروتوكسین‌های اسهالی می‌باشد. در این آزمایش، فعالیت HBL مشابه با توکسین کلرای و با می‌باشد. بنابراین این توکسین می‌تواند یک فاکتور ویرولانس اولیه در باسیلوس سرئوس اسهالی باشد. HBL تقریباً توسط ۴۵-۶۵ درصد از سوبه‌های باسیلوس

هپاتوسیت‌ها ایجاد می‌کند. ترمیم تغییرات آسیب شناسی و احياء هپاتوسیت‌ها بعد از ۴ هفته مشاهده می‌شود. سرئولید همچنین باعث آسیب بافت سلولی و نیز مهار کشنندگی طبیعی سلول‌های سیستم ایمنی انسان می‌شود (۶). این توکسین به گرما، آنزیم‌های پروتئولیتیک و pH آسیدی مقاوم است اما آتنی 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 ارگانیسم 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 سه 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 بالایی از ناهمگنی مولکولی در HBL نژادهای مختلف وجود دارد. در یک مطالعه ۱۲۷ باسیلوس سرئوس به وسیله آنالیز وسترن بلاط، ۴ سایز از B (۴۱، ۴۲، ۴۶، ۴۸ کیلو دالتونی)، دو L1 (۴۱ و ۴۳ کیلو دالتونی) و سه L2 (۴۳، ۴۵، 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 B₁, B₂ و L₁ می‌باشد که توسط باسیلوس سرئوس تولید می‌شود. انتروتوكسین HBL در برابر گرما ناپایدار و نسبت به پروتئازها حساس است. فعالیت این انتروتوكسین شامل تحیریک آدنیلات سیکلاز حلقوی (cAMP) در روده است که احتمالاً در عفونت‌های غیر گاستروآنتریتی نقش دارند. احتمال این

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 و L_1 از HBL به ترتیب توسط ژن‌های $hblC$ و $hblA$, $hblD$ و $hblA$, $hblC$ در یک اپرون پشت سرهم با $hblC$ و $hblA$, $hblD$ در موقعت بالا دست ژن $hblC$ قرار دارند که به ترتیب اجزاء L_2 , L_1 و B را کد می‌کنند. پایین دست ژن $hblB$, ژن $hblA$ قرار دارد که حدوداً ۵۸ درصد همسانی با $hblA$ درصد ۱۵۸ اسید آمینه اولیه دارد. محصول ژن $hblB$ هنوز جداسازی نشده است. 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 ایزوforme‌ها 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 Fnr , $ResD$, $PlcR$, $CcpA$ و $Plcr$ تنظیم می‌شود. $Plcr$ به صورت خودکار کار می‌کند و بیان اپرون HBL را با اتصال به توالی مخصوص فعل می‌کند (۸). نواحی پالیندروم $(TATGNAN4TNCATA)Plcr-box$ 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 $PapR$ (پیتید خود تحریکی که وقتی که تراکم سلولی بیشتر می‌شود درون باکتری‌ها انباسته می‌شود) فعل می‌شود، که اتصال $Plcr$ به $PLcr-box$ را تسهیل می‌کند $ResDE$. $ResDE$ پاسخی تنظیمی از سیستم دو جزئی است که تحت شرایط بی‌هوایی و پتانسیل اکسید و احیاء پایین فعل می‌شود. $ResD$ بیان ژن hbl را به طور مستقیم از طریق اثر متقابل با ناحیه پروموتور اپرون hbl تنظیم می‌کند و نیز ژن‌های fnr و $resDE$, $plcR$ انتروتوکسین

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 واضح تشکیل می‌دهد که به سمت کلنی حرکت می‌کند (۱۸). سه پروتئین HBL از آزادانه به اریتروسیت‌ها متصل می‌شوند و اجزاء HBL در اتصال به غشاء یک کمپلکس غشایی را تشکیل می‌دهند که باعث لیز توسط مکانیسم اسمزی کلوئیدی 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 (α/β به غشاء سلول‌های مخصوص چسبیده و وارد می‌شود). این ساختار HBL شدیداً شبیه همولیزین E در اشرشیاکلی (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 B یا سر دمین همولیز است که با تغییرات شکلی در جزء B یا سر دمین با استفاده از اجزاء L_1 و L_2 در الحال به غشاء صورت می‌گیرد (۲۸, ۷۲). توالی‌های اسید آمینه سه پروتئین HBL نشان می‌دهد که دارای همولوژی ۲۰-۲۴ 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 ۶۰ و ۴۷ اسید آمینه‌ای هستند در حالی که L_2 شامل قطعه ناقل غشایی نیست. هتروژنیستی مولکولی 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 گوسفتند وقتی که به تنها یک 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.



را تنظیم می کنند (۴۳، ۸). fnr برای بیان کل ژن hbl لازم است که به مقدار اکسیژن وابسته است و کربوهیدرات را به عنوان منبع کربن استفاده می کند. این پروتئین بیان ژن hbl را از طریق توالی پرومотор pphb و pphcR فعال می کند (۴۴). پروتئین کاتابولیک کننده CcpA (عنصر CCRE) به عنوان تنظیم کننده رونویسی به مسئول کاتابولیتی (CRE) در حضور گلوکز این پروتئین (CcpA) بیان ژن hbl را با اتصال به جایگاه CRE که در اپرون شناسایی شده است، مهار می کند. تنوع وسیعی از سیگنال ها و پروتئین ها به عنوان تنظیم کننده رونویسی m hbl عمل می کنند. بنابراین تولید HBL توسط باسیلوس سرئوس شدیدا کنترل می شود (۷۴).

ترشح HBL

باسیلوس سرئوس های دارای تعداد فلاژل های زیادی نسبت به سلول های متحرک رویشی، مقدار HBL زیادی را ترشح می کنند. بنابراین هر چه تعداد فلاژل ها بیشتر باشد ترشح HBL نیز بیشتر است. همه این یافته ها بیانگر این موضوع هستند که فلاژل به عنوان عامل ویرولانس در عفونت های باسیلوس سرئوس نقش دارد. در نتیجه می توان گفت که فلاژل باعث تسهیل اتصال به سلول میزبان، افزایش ترشح HBL و تمایل بیشتر به سطوح مخاطی سلول میزبان می شود (۷۵، ۷۶) آنالیز توالی آمینو اسیدی سه پروتئین HBL نشان می دهد که هر سه جزء آن توالی پیتیدی مشخصی در اسید آمینه انتها بیانگر این ترشح آن ها از طریق راه ترشحی وابسته به S می باشد (Sec). باکتری های فلاژل دار، فلاژل را از طریق سیستم Sec خارج می کنند که برای ترشح HBL مورد نیاز است (۳۶). کمپلکس خارج کردن فلاژل همچنین YplA می تواند برای ترشح پروتئین های غیر فلاژلی مانند در باکتری یرسینیا انتروکولیتیکا عمل کند (۸). تشابه بین III ساختار بیرون برنده فلاژل با سیستم ترشحی نوع پیشنهاد می کند که آن ها ممکن است منشا یکسانی داشته باشند که در عملکرد اشتراکی شرکت دارند (۷۷).

مسومومیت نوع اسهالی

شروع اسهال آبکی، گرفتگی عضلات شکمی و درد در

۱۵ ساعت پس از مصرف غذاهای آلوده اتفاق می افتد. مقدار اسپور باسیلوس سرئوس خورده شده در سندرم اسهالی تقریبا ۱۰۵-۱۰۷ گرم است. همراه با اسهال، حالت تهوع هم ممکن است وجود داشته باشد، اما استفراغ خیلی کم اتفاق می افتد. اغلب، این علایم بیشتر از ۲۴ ساعت وجود دارند. علت مسمومیت اسهالی، تولید انتروتوکسین ناپایدار در برابر گرما و حساسی به شرایط اسیدی معده است. سندرم اسهالی توسط باسیلوس سرئوسی که دارای یک یا سه انتروتوکسین اسهالی است، ایجاد می شود: توکسین های ۳ جزء همولیزین BL (HBL) و انتروتوکسین غیر همولیتیک (NHE)، ۲ نوع سیتو توکسین تک جزئی cytK-2، cytK-1 (K). اگر این توکسین ها از قبل غذا تشکیل شده باشند آنزیم های پروتئولیتیکی و pH اسیدی معده، این انتروتوکسین ها را در ناحیه روده ای - معده ای هضم می کنند. (۳۵ و ۳۶).

مسومومیت نوع استفراغی

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

پیشگیری از مسمومیت غذایی

پختن کامل غذا، اغلب باعث از بین رفتن سلول های رویشی و اسپورها می شود. اما دمای های کمتر از ۱۰۰ درجه پخت ممکن است فرست 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 سلول های رویشی در غذاهای گوشتی آماده و پخته

از بین رفتن سلول‌های رویشی و اسپورها می‌شود و اما دمای کمتر از ۱۰۰ درجه سلسیوس ممکن است فرصت بقاء را به اسپورها بدهد. از ذخیره غیریخچالی 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 نرن (۲۷۹).

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 – carare 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.
- 3- 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. Berkrly, and 1\1. 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 Enterotoxic *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 Immunodominant Spore Antigens of *Bacillus anthraci* .. *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*, 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. I. 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. Vol. 2. 678-687.
- 15-Sagripanti, J. L, Carrera, M, Insalaco, J, Ziemska, 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. O, 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), 1 92-1197.
- 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, Keirn. 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-Cassity R. R. B. J. Kolodziej. *Isolation Pcl11ial Characterization and Utilization of J Polysaccharide from Bacillus megaterum 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 RSVFI, 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, Koichinsky. R, Rainey. F. A, Lo. SH. CH, *The Arthromitus Stage of Bacillus cereus: Intestinal Symbionts of Animals*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998.95.1236-1241.
- 31-Swiecicka. I, Mahillon. J, *Diversityof Commensal Bacillus cereus sensu lato Isolated from the Common SO⁺ Bug(Porccho. cab r. Isopoda)*, *FEMS Tvlicrobiol 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, SchocnI. J, Lee Wong. . C, *Enterotoxic Activity of Hemolysin BL from Bacillus cereus*. *Infection and Immunity*, 1995, 63(11). 4423-4428.
- 37-Ghelardi. E, Celadroni. 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, *Tlipartite 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, Vong, A. C, *Heterogeneity Observed in the Components of Hemolysin BL, an Enterotoxin Produced by Bacillus cereus*, *Int. J. Food Microbiol*. 1999,53, 159-1 67.



41-Beecher, D.J.; Wong, A.C. *Tripartite Hacnolysin 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. *PICR 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 involves the Redox-Sensitive ResDE Signal Transduction System*. *J. Baeteriol.* _006. 1 > 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, Celadroni, F, Salvetti, S, Beecher, D. J, Gominet, M, Lereclus, D, Wong, A. C, Senesi, S, *Requirement of tlaA 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, Celadroni, F, Ceragioli, M, Giannessi, 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, Fagerlund, A, Rodland, M, S. Granum, P. E, *Characterization of the Bacillus cereus Nhe enterotoxin*. *Microbiology*, 2004, ISO, 3959-3967.

49-Fagerluud, 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 PICR 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 C) totoxin 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-Paakkonen, 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*, *Toxicon*, 2007, 49, 351-367.

60-Apetroaie-Constantin, G, Shaheen, R, Andrup, L, Smidt, L, Rita, H, alkinoja-Salonen, M, *Environment Driven Cereulide Production by Emetic Strains of Bacillus cereus*, *International Journal of Food Microbiology*, 2008, 127, 60-67.



61-Haggblom. 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. Fromsoil 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 Di tribu ion and Heterogeneity of Hemolysin BL Gene among *Bacillus* Revealed cereus I olate 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. I, 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, PrIest. F. G, The Occurrence of *Bacillus cereus* in some Dried Foods Including Pulsesand Cereals, Jonmul of Applied Bucreriology, 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 Intluene of . isin on the Thermal Resistance of *Bacillus cereus*. Journal of Food Prate i n. 2002. 65. 415-418.

78-Chang YH, 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 an Environmental Microbiology. 2003. 69:8,4502-4510.

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

