فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری
شماره پیاپی ۳۲، جلد ۹، شماره ۱، زمستان۹۴، صفحه ۶۹ تا ۷۷

جداسازی باسیلوس های سرئوس از مواد غذایی و مطالعه تاثیر سایتو توکسیسیته آن‌ها بر روی سلول های Vero

زهرا دیلمی خیابانی[1]، شهرزاد نصیری سمنانی[1]
۱– استادیار دانشکده علوم پایه و پزشکی، واحد زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان. ایران.Zdeilami@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹٤/۷/۲٤ تاریخ پذیرش: ۹٤/۱۲/۵

چکیده

مقدمه و هدف: باسیلوس سرئوس از مهم ترین باکتری های عامل مسمومیت غذایی در انسان می باشد. انتروتوکسین های سه جزیی این باکتری شامل کمپلکس های HBL و NHE می باشد که از ژن های این کمپلکس می توان جهت شناسایی سویه های بیماری زا استفاده نمود. هدف از این مطالعه بررسی میزان شیوع ژن های انتروتوکسیژنیک در باسیلوس سرئوس های جدا شده از مواد غذایی مختلف و اثر آن بر روی سلول های Vero می باشد.

روش کار: در این مطالعه، ۲۲۰ نمونه غذایی شامل ۸۰ فرآورده گوشتی آماده، تعداد ۲۰ نمونه لبنیات شامل شیر پاستوریزه و محلی و پنیر، خامه و بستنی و۲۰ نمونه برنج و۱۰۰ نمونه سالاد های سرو شده در رستوران های شهر تبریز و زنجان در بین سال های ۱۳۹۳-۱۳۹۱ جمع آوری شده و از نظر آلوده بودن به باکتری باسیلوس سرئوس هم از نظر بیوشیمیایی و هم مولکولی بررسی گردید. سپس سویه های حاوی کمپلکس NHE، HBL و یا هردو کمپلکس با پرایمرهای اختصاصی و روش PCR تفکیک شدند. باسیلوس سرئوس-هایی که هر دو کمپلکس را دارا بودند، جهت بررسی میزان سایتو توکسیسیتی سلول های Vero استفاده شد.

یافته ها: از نمونه های غذایی مورد مطالعه، ۱۰۰ نمونه آلوده به باسیلوس سرئوس بودند که از این تعداد ٤۰ جدایه حاوی NHE، ۲۳ نمونه حاوی HBL و ۱۷ نمونه هر دو کمپلکس را نشان دادند. انکوباسیون سلول های Vero با باسیلوس سرئوس های حاوی HBL و NHE نشان داد که این باکتری ها اثر سایتو توکسیک بر روی آن ها داشته و باعث تغییر شکل و از بین رفتن ۸۰ درصد سلول ها شدند.

نتیجه گیری: استفاده از تکنیک و روش سریع PCR برای تشخیص حضور باسیلوس سرئوس انتروتوکسیژنیک در غذا از اهمیت زیادی برخوردار است تا از سلامتی غذای مصرفی اطمینان حاصل شود. افزایش اطلاعات درباره بیماری زایی و شیوع ژن های عامل مسمومیت می تواند باعث کاهش مسمومیت های غذایی گردد.

واژه های کلیدی: باسیلوس سرئوس، NHE, HBL, PCR، سلول های Vero.

مقدمه

باسیلوس سرئوس باسیل گرم مثبت، اسپوردار و هوازی بی¬هوازی اختیاری از خانواده¬ی باسیلاسه است. این باکتری متحرک، همولیتیک فعال، کاتالاز مثبت، مقاوم به پنی¬سیلین، فاقد رشد ریزوئید است. دمای مناسب رشد این باکتری ۳۰ تا ۳۵ درجه¬ی سانتی¬گراد است ولی تا دمای ۴۸ درجه¬ی سانتی¬گراد و در دمای پایین¬تر از ۷ درجه¬ی سانتی¬گراد نیز قادر به رشد می باشد. pH مناسب برای رشد آن ۴/۹ تا ۹/۳ است(۱۹، ۴، ۱). اسپورهای باسیلوس سرئوس و اشکال رویشی به طور گسترده¬ای در طبیعت، آب و خاک پراکنده شده¬اند، به طوری که می¬توان آن ها را از مواد غذایی گوناگون جدا نمود. باسیلوس سرئوس به عنوان یکی از مهم ترین عوامل شایع مسمومیت غذایی در انسان شناخته شده است. طی گزارشات،این باکتری از مهم ترین بیماری زا های مواد غذایی مختلف هم چون لبنیات، غلات، برنج و نیز مواد گوشتی می باشد(۲۹،۲۸، ۲۴، ۱۶، ۱۵، ۱۴، ۱۳، ۹، ۸). اسپورهای باسیلوس سرئوس حتی پس از پختن در غذا باقی می‌مانند و در صورتی که مواد غذائی در شرایط گرم و مرطوب نگه داری شوند اسپور به باسیل تبدیل شده و پس از تکثیر در غذا یا روده نوعی سم

روده‌ای(انتروتوکسین) تولید می¬کند که منجر به مسمومیت غذائی می‌گردد. این ارگانیسم به عنوان عامل پایدار در مراحل پاستوریزاسیون شیر و به عنوان پاتوژن فرصت طلب شناسایی شده است. برخی از ایزوله های باسیلوس سرئوس می توانند در شرایط یخچال رشدکنند و اسپورها توانایی تحمل دماهای بسیار بالا را دارند(۳۱، ۲۳، ۶). دو نوع مختلف مسمومیت غذایی یعنی نوع اسهالی و استفراغی توسط باسیلوس سرئوس ایجاد می-شود که در آن به ترتیب ژن های کمپلکس NHE و HBL نقش دارند. کمپلکس NHE و HBL از توکسین-های سه جزءی این باکتری می باشند. NHE شامل اجزا A، B و C که به ترتیب توسط ژن¬های nhe A، nheB و nheC کد می شوند(۱۳). HBL نیز شامل قسمت های B، L1 و L2 بوده و ژن های hblA، hblD و hblC به ترتیب کد کننده اجزا این کمپلکس می باشند. حضور تمامی اجزا برای ایجاد مسمویت لازم می‌باشد(۲۷، ۲۱، ۱۹، ۱۸، ۶). توکسین NHE برای اولین بار از سویه باسیلوس سرئوس در یک مسمومیت غذایی در نروژ جدا شد. در سال ۲۰۰۷ نیز داس (Das) و همکارانش بر روی باسیلوس سرئوس جدا شده از غذا های دریایی نشان دادند که تمام جدایه‌های تولید کننده انتروتوکسین اسهالی کمپلکس NHE را دارند در حالی که جدایه های غیر انتروتوکسیژنیک فاقد این کمپلکس می باشند(۶). پروب(Prub) و همکارانش در سال ۱۹۹۹ شیوع انتروتوکسین HBL را بین گروه باسیلوس سرئوس بررسی کردند و گزارش نمودند که ۴۳ درصد از سویه¬های باسیلوس سرئوس حاوی ژن hblA هستند(۲۵). در سال¬های اخیر افزایش نگران کننده¬ای از عفونت¬های روده¬ای مربوط به باسیلوس سرئوس دیده شده است. با توجه به این که باسیلوس سرئوس یک باکتری اسپورزا می باشد، احتمال آلودگی مواد غذایی مختلف با این باکتری وجود دارد. حرارت و گرم کردن غذا تعداد بسیاری از باکتری های رویشی را کم می کند ولی توکسین مقاوم به حرارت مولد اسهال و استفراغ را غیر فعال نمی نماید. هدف از این مطالعه بررسی شیوع ژن‌های کمپلکس NHE و HBL در باسیلوس سرئوس-های جدا شده از مواد غذایی مختلف از جمله فرآورده-های گوشتی، لبنیات، برنج و سالاد بود و در ادامه تاثیر باکتری های توکسین زا بر روی رشد سلول های Vero بررسی گردید. برای شناسایی باکتری های توکسین زا، از پرایمرهای اختصاصی کمپلکس NHE و HBL و روش PCR، استفاده شد و جدایه هایی که هر دو کمپلکس را دارا بودند برای تاثیر سایتوتوکسیسیتی سلول های Vero مورد استفاده قرار گرفتند. با توجه به گزارشات مبنی بر شیوع بالای مسمومیت های غذایی، نتایج این مطالعه می-تواند در زمینه میزان شیوع ژن های انتروتوکسین در مواد غذایی موردبررسی، مفید باشد.

مواد و روش ها

جمع آوری نمونه های گوشتی و جداسازی باسیلوس سرئوس

تعداد ۲۲۰ نمونه غذایی شامل ۸۰ نمونه مواد گوشتی آماده و ۲۰ نمونه لبنیات شامل شیر پاستوریزه و محلی و پنیر، خامه و بستنی، ۲۰ نمونه برنج و ۱۰۰ نمونه سالادهای سرو شده در رستوران های شهر تبریز و زنجان در بین سال های ۱۳۹۳-۱۳۹۱ جمع آوری شده و جهت بررسی حضور باسیلوس سرئوس توکسین زا انتقال یافت. جهت جداسازی باسیلوس ابتدا رقت های مختلف از آن ها تهیه گردید(۱-۱۰، ۲-۱۰ و ۳-۱۰) از رقت¬های تهیه شده ۱ میلی¬لیتر در لوله¬های حاوی محیط BHI براث(محیط غنی کننده) اضافه و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۲ درجه¬ی سانتی¬گراد گرماگذاری گردید. یک لوپ از محیط حاوی باکتری برداشته و روی محیط PEMPA (Polymixin Pyruvate-Egg Yolk ManitolBromocresol Purple Agar–، کشت داده و در انکوباتور ۳۷ درجه¬ی سانتی¬گراد به مدت ۴۸ ساعت گرمادهی

شدند(۶، ۵). بعد از این مدت کلنی¬های صورتی دارای هاله¬ی لسیتیناز(Lecithinase) به محیط نوترینت آگار منتقل شدند و رنگ آمیزی گرم و اسپور و هم¬چنین آزمایشات بیوشیمیایی که شامل تست کاتالاز، تحرک، vp، احیاء نیترات، آمیلاز(هیدرولیز نشاسته) و همولیز بتا انجام گردید(۶، ۵).

استخراج DNA برای واکنش PCR

استخراج DNA از باسیلوس سرئوس با استفاده از روش انجماد و جوش انجام گرفت. در این روش ابتدا باکتری¬ها در محیط نوترینت آگار در ۳۷ درجه سانتی¬گراد به مدت ۱۶ ساعت کشت شدند. به اندازه¬ی ۱ لوپ از کلنی برداشته و در ۱۵۰ میکرولیتر آب مقطر اتوکلاو شده معلق کرده، سپس نمونه ها به مدت ۲۰ دقیقه در ۸۰- درجه¬ی سانتی¬گراد قرار گرفتند و در مرحله¬ی بعد به مدت ۱۰ دقیقه در داخل آب جوش۱۰۰ درجه¬ی سانتی¬گراد قرار گرفتند. سپس به مدت ۱۰ ثانیه در 11000 rpm عمل سانتریفیوژ انجام شد. مایع رویی حاوی DNA است، فاز رویی به میکروتیوب های جدید انتقال یافتند(۶، ۵). واکنش های PCR با استفاده از پرایمر اختصاصی باسیلوس سرئوس پس از انجام تست¬های بیوشیمیایی و مشخص شدن کلنی¬های باسیلوس سرئوس، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی گروه باسیلوس سرئوس جهت تایید کلنی آن-ها PCR با پرایمرهای زیر برای نمونه ها انجام گرفت(۳۲، ۳۰، ۲۰، ۷، ۶، ۴، ۳). برای انجام واکنش PCR مخلوط واکنش شامل بافر PCR ۵ میلی مول KCl، Tris-HCl ۱میلی مول، ۱/۵ میلی مول$MgCl_2$، ۲/۵میلی مول dNTP، پرایمر رفت ۱۰ پیکومول، پرایمر برگشت ۱۰ پیکومول، آنزیم Taq پلیمراز ۵ واحد در میکرولیتر، ۲۰نانوگرم در میکرولیتر در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر تهیه شد. برنامه دمایی دستگاه ترمال سایکلر شامل واسرشته سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه، واسرشته سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال پرایمر به رشته های الگو در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد برای ۱ دقیقه، بسط رشته DNA توسط پلیمراز در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه که سه مرحله اخیر ۳۰ بار تکرار گردید و در نهایت با بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای واکنش ها اتمام یافت و محصول PCR روی ژل آگارز۱ درصد بررسی شد(۶). واکنش های PCR با استفاده از پرایمرهای ژن های کمپلکس NHE(nheA، nheB، nheC) و کمپلکس HBL(hblA،hblC،hblD) صورت گرفت.

باسیلوس سرئوس

جهت انجام این واکنش پس از استخراج DNA از نمونه ها به روش فریز- جوش ازپرایمرهای کمپلکس NHE (nheA،nheB،nheC) و کمپلکس HBL(hblD ،hblA, hblC) استفاده شد(جدول ۱). مخلوط واکنش PCR با پرایمر های فوق و مطابق با موارد گفته شده برای پرایمرهای اختصاصی باسیلوس سرئوس، تهیه گردید. برنامه دمایی دستگاه ترمال سایکلر برای کمپلکس NHE و HBL شامل واسرشته سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه، واسرشته سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال پرایمر به رشته های الگو در دمای ۵۶ درجه سانتی گراد(برای کمپلکس NHE) و ۵۸ درجه سانتی گراد(برای کمپلکسHBL) برای ۱ دقیقه، بسط رشته DNA توسط پلی مراز در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه که سه مرحله اخیر ۳۰ بار تکرار و در نهایت با بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد برای واکنش ها اتمام یافت. محصول PCR روی ژل آگارز۱ درصد بررسی شد(۳۰، ۲۰، ۶، ۴).

کشت سلول های Vero و بررسی میزان توکسیسیته

سلول های باکتری ایزوله شده در محیط BHI که حاوی ۱٪ گلوکز و دمای ۳۲ درجه سانتی گراد به مدت ۶ ساعت کشت داده شدند. سلول ها به مدت ۵ دقیقه

در ۱۱۰۰۰rpm سانتریفوژ شدند. سوپرناتانت در دمای ۲۰ –درجه سانتی گراد تا زمان آزمایش نگهداری شدند(۱۰). سلول های Vero پس از تهیه در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰٪ FBS در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و انکوباتور ۵٪CO_2 کشت داده شدند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوپرناتانت باکتری تهیه شده در مرحله قبل بر روی سلول های Vero اضافه شده و پس از ۱، ۳ و ۵ ساعت انکوباسیون دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵٪ CO_2 شکل ظاهری سلول های مورد مطالعه(از نظر متورم شدن و تغییر شکل دادن) با کنترل مقایسه شدند(۱۰).

جدول ۱–پرایمرهای کمپلکس های NHE و HBL

B. cereus group	5′- TGCAACTGTATTAGCACAAGC T -3′ 5′- TACCACGAAGTTTGTTCACTACT -3′	*BalF* *BalR*
nheA	5′-ATTAAGGTAAATGCGATGAG-3′ 5′-GCTTCAGTTTGTGATAACTT-3′	
nheB	5′-CTATCAGCACTTATGGCAG-3′ 5′-ACTCCTAGCGGTGTTCC-3′	
nheC	5′-CGGTAATGATTGCTGGG-3′ 5′-CAGCATTCGTACTTGCCAA-3′	
hblA	5 - GCTAATGTAGTTTCACCTGTAGCAAC- 3 5 - AATCATGCCACTGCGTGGACATATAA- 3	
hblD	5 -AATCAAGAGCTGTCACGAAT-3 5 -CACCAATTGACCATGCTAAT-3	
hblC	5 -AATGGTCATCGGAACTCTAT-3 5 -CTCGCTGTTCTGCTGTTAAT-3	

نتایج

نتایجPCR با پرایمر های اختصاصی جهت تایید کلنی های باسیلوس سرئوس

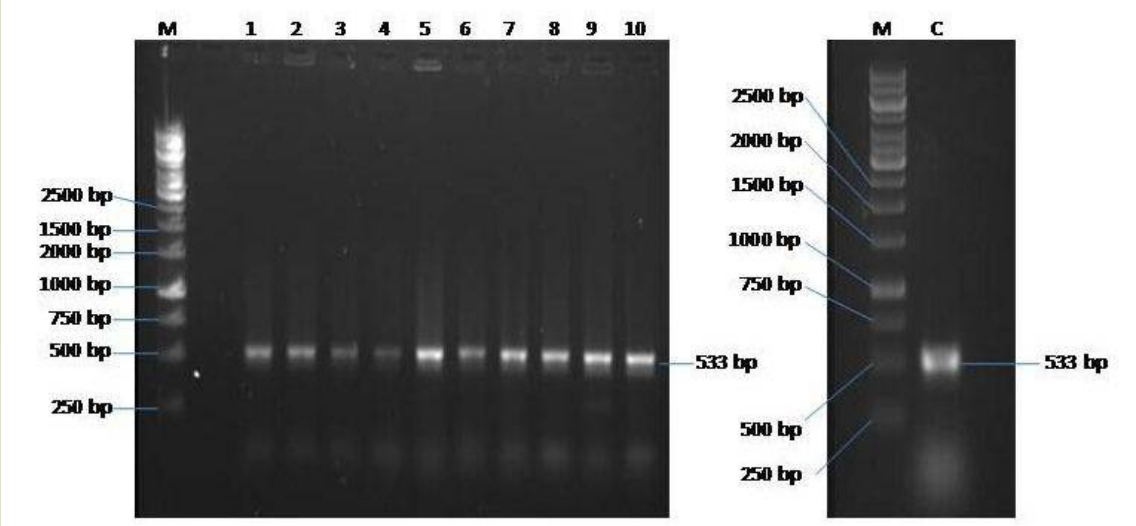
بر روی DNAهای استخراج شده از تمام نمونه ها، با استفاده از پرایمر اختصاصی باسیلوس سرئوس واکنش¬های PCR انجام گرفت. سپس محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد مطالعه شدند. تمام جدایه های تایید شده در روش بیوشیمیایی قطعه ۵۳۳ جفت بازی را نشان دادند. شکل ۱– نمونه ای از الکتروفورز باسیلوس سرئوس های جدا شده از مواد غذایی مورد مطالعه را با استفاده از پرایمر های اختصاصی نشان می دهد. از ۲۲۰ نمونه مورد مطالعه، ۱۰۰ نمونه آلوده به باسیلوس سرئوس بودند.کنترل مثبت استفاده شده در این مطالعه، مربوط به باسیلوس سرئوس انتروتوکسیژنیک می باشد که در آزمایشگاه جداسازی شده و حضور ژن های کمپلکس NHE وHBL در آن تایید شده است(شکل ۱).

نتایج PCR با پرایمر های اختصاصی کمپلکس NHE و HBL

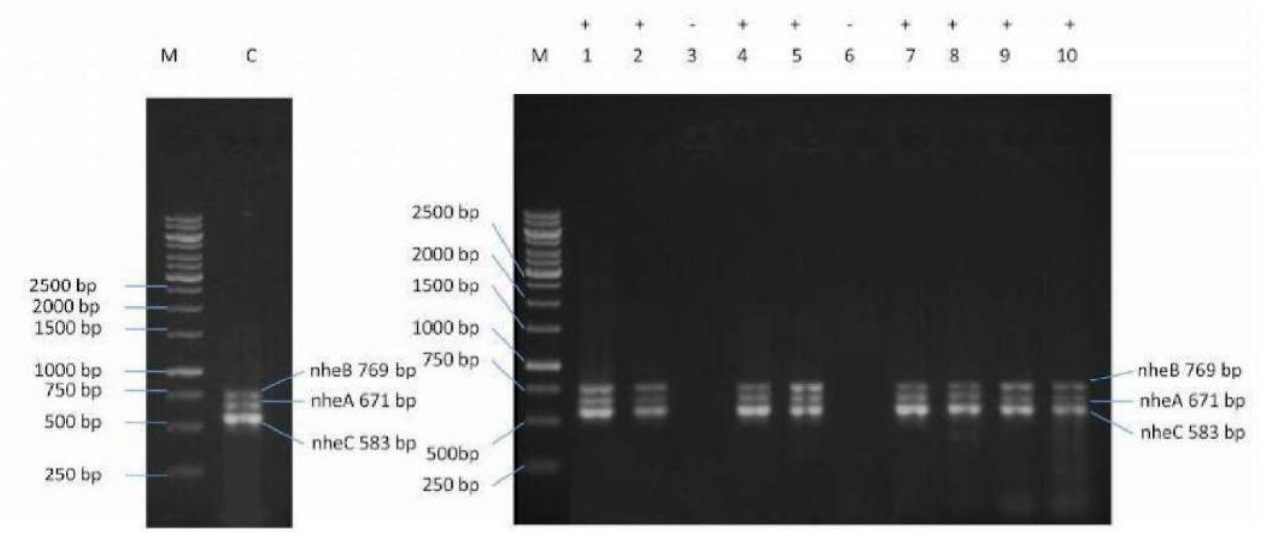
در این مرحله باسیلوس سرئوس های جدا شده، با پرایمر های ژن های nheA، nheB و nheC و روش PCR بررسی شدند. از ۱۰۰ جدایه باسیلوس سرئوس ۴۰ نمونه کمپلکس NHE شامل nheA با ۶۷۱ جفت باز، nheB با ۷۶۱ جفت باز و nheC با۵۸۳ جفت باز مشخص شد(شکل۲)، هم چنین باسیلوس سرئوس های جدا شده، با پرایمر های کمپلکس HBL شامل ژن های hblA، hblC و hblD بررسی گردیدند. از ۱۰۰ جدایه باسیلوس سرئوس ۲۳ نمونه کمپلکس HBL شامل hblA با ۸۳۴ جفت باز hblC ۷۵۰ جفت باز، hblD با ۴۳۰جفت باز نشان دادند(شکل۳). در این میان۱۷ جدایه هر دو کمپلکس HBL و NHE را دارا بودند(نمودار ۱)، که از این جدایه ها جهت بررسی میزان توکسیسیته سلول های *Vero* استفاده گردید.

نتایج مربوط تاثیر باسیلوس سرئوس های حاوی کمپلکسNHE و HBL بر روی سلول های Vero

تمامی ۱۷ جدایه باسیلوس سرئوس که نسبت به هر دو کمپلکس HBL و NHE مثبت بودند پس از ۵ ساعت انکوباسیون، باعث متورم شدن و تغیر شکل ۸۰ درصد از سلول های Vero شدند. این نتیجه نشان دهنده تاثیر سایتو توکسیسیتی بالای توکسین های HBL و NHE تولید شده توسط جدایه های باسیلوس سرئوس می باشد.

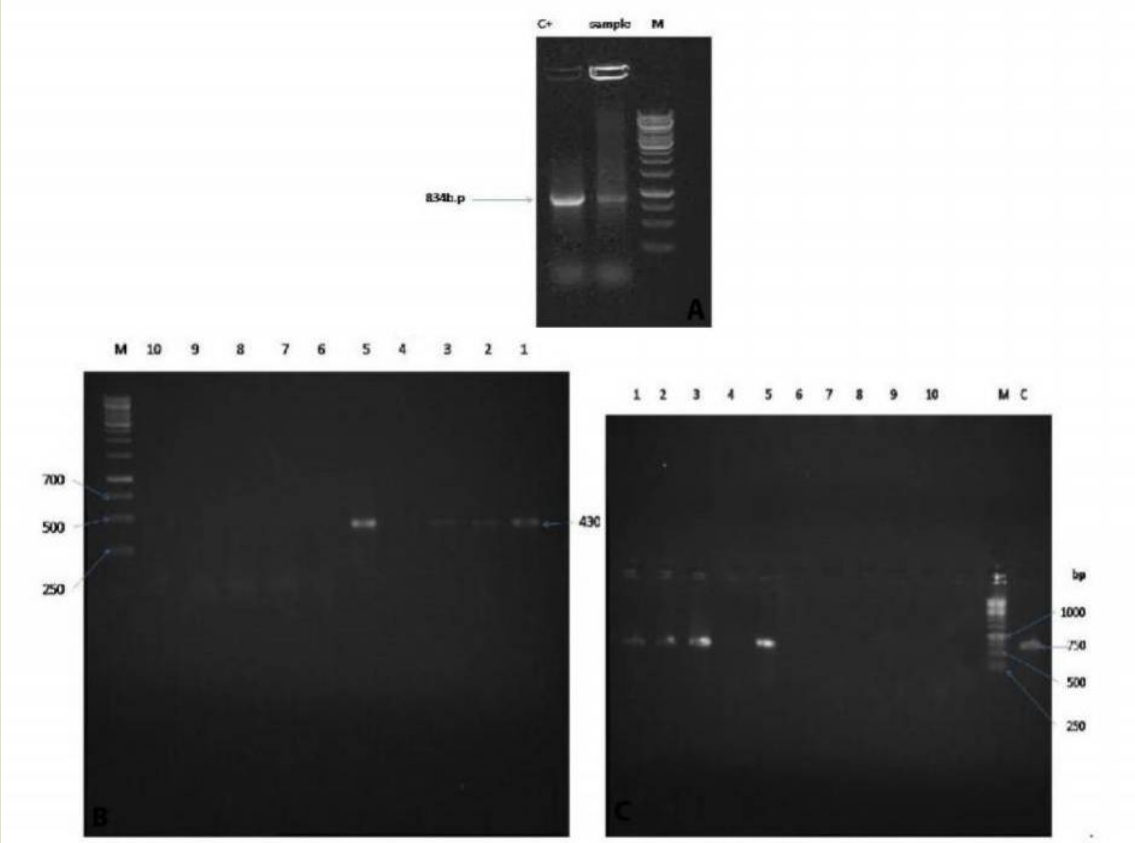


شکل ۱- پرایمر اختصاصی باسیلوس سرئوس واکنش¬های PCR



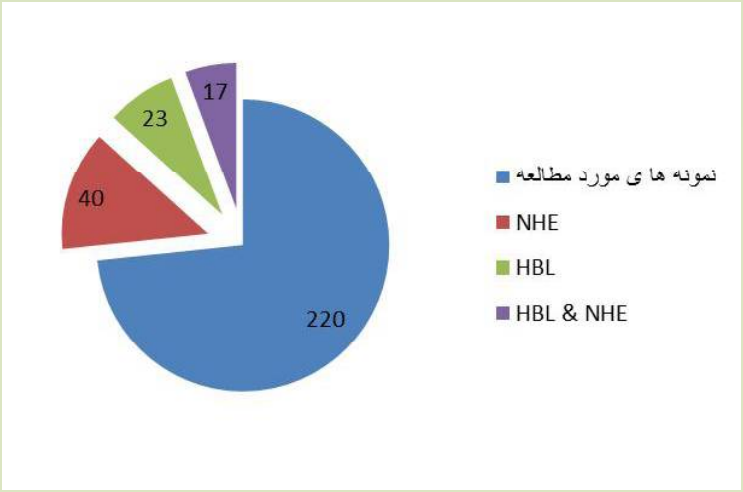
شکل ۲ – نتیجه ی الکتروفورز مربوط به واکنش مولتی پلکسPCR با پرایمرهای ژن های کمپلکس NHE

هم چنین باسیلوس سرئوس های جدا شده، با پرایمر های کمپلکس HBL شامل ژن های *hblA*، *hblC* و *hblD* بررسی شدند. از ۱۰۰ جدایه باسیلوس سرئوس ۲۳ نمونه کمپلکس HBL شامل *hblA* با ۸۳۴ جفت باز *hblC* ۷۵۰ جفت باز *hblD,* با ۴۳۰جفت باز نشان دادند.۲۰ جدایه هر دو کمپلکس HBL و NHE را دارا بودند



شکل ۳- نتیجه ی الکتروفورز مربوط به واکنش PCR با پرایمرهای ژن های کمپلکس HBL.

شکل A مربوط به hblA باند ۸۳۴ جفت بازی، شکل B مربوط به hblC باند ۷۵۰ جفت بازی و شکل C مربوط به hblD باند ۴۳۰ جفت بازی را نشان می دهد. M: مارکر 1Kbp



نمودار۱- توزیع نسبت ژن های کمپلکس *HBL* و *NHE*

بحث و نتیجه گیری

مسمومیت غذایی ایجاد شده با باسیلوس سرئوس برای اولین بار توسط هیوج در سال ۱۹۵۰ توصیف شده است(۹). اکثر سویه‌های باسیلوس سرئوس توانایی تولید سم اسهالی یا استفراغی دارند و تعداد قابل توجهی از جدایه ها هر دو نوع سم را تولید می‌کنند. این ارگانیسم در همه‌ی محیط‌ها وجود دارد و مواد غذایی را آلوده می‌کند(۶، ۲). باسیلوس سرئوس به دلیل اسپورزایی، می تواند شرایط سخت را تحمل نموده و در نهایت جوانه زده و رشد نماید و سم مولد اسهال و استفراغ را تولید

نماید. هدف از این مطالعه بررسی حضور باسیلوس سرئوس های انتروتوکسیژنیک در تعدای از مواد غذایی مختلف شامل فرآورده های گوشتی آماده، لبنیات، برنج و سالادهای عرضه شده در رستوران های شهر زنجان و تبریز می باشد. از ۲۲۰ نمونه مواد غذایی جمع آوری شده، ۱۰۰ نمونه از نظر وجود باسیلوس سرئوس مثبت بودند، که این مورد هم از نظر تست‌های بیوشیمیایی و هم مولکولی تایید شدند. از ۱۰۰ نمونه ۴۰ جدایه نسبت به کمپلکس NHE، ۲۳ جدایه نسبت به کمپلکس HBL و ۱۷ جدایه حاوی هر دو کمپلکس بودند. در مطالعه‌ی داس(Das) و همکارانش که در سال ۲۰۰۹ در هند روی باسیلوس سرئوس جدا شده از ماهی صورت گرفت، مشخص گردید که ۲۹/۴ درصد از نمونه‌ها برای باسیلوس سرئوس انتروتوکسیژنیک مثبت بودند(۶). در مطالعه حاضر از ۲۲۰ نمونه مواد غذایی مورد مطالعه ۱۳ درصد نسبت به کمپلکس NHE ، ۸ درصد نسبت به کمپلکس HBL مثبت بوده و ۶ درصد نمونه ها هر دو کمپلکس را دارا بودند امبوی(ombui) آلودگی غذا با باسیلوس سرئوس انتروتوکسیژنیک را با روش PCR نشان داد و از ۱۰۸ نمونه‌ی جدا شده ۱۴ نمونه(۹/ ۱۲درصد) با روش PCR، آلوده به باسیلوس سرئوس انتروتوکسیژنیک تشخیص داده شدند(۲۴). پروب (Prub) و همکارانش شیوع انتروتوکسین HBL را در بین گروه باسیلوس سرئوس بررسی کردند. نتایج این بررسی‌ها نشان داد که انتروتوکسین همولیتیک HBL در بین سویه-های گروه باسیلوس سرئوس گسترده است و به گروه خاصی یا محیط مخصوصی مربوط نیست(۲۵). گیتاهی و همکارانش درسال ۲۰۰۹در کنیا حضور کمپلکس NHEرا در تولیدات شیر و پنیر و برنج پخته مطالعه کردند و از ۵۱ نمونه‌ی باسیلوس سرئوس جدا شد که ۱۲ نمونه(۳۳/۳ درصد) از شیر و ۸ نمونه(۲۲/۲ درصد) از پنیر و ۳۱ نمونه (۶۰/۷ درصد) از برنج بودند(۱۱). فروم (From)و همکارانش در سال ۲۰۰۵ از سلول های Vero برای بررسی توکسیسیته باسیلوس سرئوس استفاده نمودند(۱۰). در این تحقیق نیز از این سلول ها استفاده گردید و نتایج نشان داد که در اثر تیمار این سلول ها با جدایه هایی که از نظر کمپلکس HBL و NHE با PCR تایید شده بودند، حدود ۸۰ درصد سلول‌های Vero از نظر ظاهری دچار تغییر شکل و متورم شدن می شوند که نشان گر سایتوتوکسیک بودن سم های تولید شده توسط جدایه ها را دارد. روش PCR یک متد سریع و قابل اطمینان برای تشخیص ارگانیسم خاص می باشد و نسبت به کیت‌های آزمایشی سریع تر و ارزان تر می باشد. مطالعه حاضر یک دیدگاه کلی نسبت به شیوع باسیلوس سرئوس های انتروتوکسیک در مواد غذایی پر مصرف را نشان می دهد. نتایج این مطالعه می تواند در ایجاد اطلاعاتی در مواد غذایی مختلف مفید باشد و نیز زمینه ای برای بررسی های آینده از جمله درک مکانیزم های بیماری زایی این باکتری ها باشد.

منابع

1. Lopez, A.C., Alippi. A.M. (2003). Entero toxigenic gen profiles of *Bacillus cereus* and *Bacillus megaterium* isolates recovered from honey . Revista Argentina, 24-29.

2.Agata, N., Ohta, M., Yokoyama, K.(2002). Production of *Bacillus cereus* emetic toxin(Cereulide) in various foods, International Journal of Food Microbiology, 73; 23– 27.

3.Ankolekar, Ch., Rahmati, T., Labbé, R. G. (2009). Detection of toxigenic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* spores in U.S rice. International Journal of Food Microbiology, 128; 460–466.

4.Bjarne Munk, H., Niels Bohse, H. (2001). Detection of enterotoxic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis. Applied and Environmental Microbiology, 185-189

5.Chang Y.H., Shangkuan, Y.H., Lin, H.Ch., Liu, H.W. (2003). PCR assay of the groEL Gene for detection and differentiation of *Bacillus*

cereus group cells. Appiled an Environmental Microbiology, 69(8); 4502-4510.

6.Das, S., Surendran, P. K., Thampuran, N. (2009). PCR-based detection of enterotoxigenic isolates of *Bacillus cereus* from tropical seafood. Indian J Med Res, 129;316-320.

7. Oltuszak-Walczak, E., Walczak, P., Modrak, R. (2006). Detection of entrotoxic *Bacillus cereus* producing hemolytic and non hemolytic enterotoxins by PCR test.Polish Journal of Microbiology, 55(2); 113-118.

8.Finlay, W. J. J., Logan, N. A., Utherland, A. D. (2002). *Bacillus cereus* emetic toxin production in cooked rice. Food Microbiology, 19; 431-439.

9.Floristean, V., Camen, C., Carp-Carare, M. (2007). Bacteriological characteristics of *Bacillus cereus* isolates from poultry. Bulletin USAMV-CN, 64; 1-2.

10. From, C., Pukall R., Schumann P., Hormazabai, V. (2005). Toxin producing ability among *Bacillus* spp. Outside the *Bacillus cereus* group. Appl. Env. Mic, 71(3); 1178-1183.

11. Gitahi, N. J., Ombui, J. N., Nduati, D. W., Gicheru, M. M. (2009). Genetis characterisation of food borne *Bacillus cereus* strains from, milk, cheese and rice by multiplex PCR assay. International Journal of Integrative Biology, 5(2), 82-86.

12. Gordon, R. E., Haynes, W. C., Pang, C. H.-N. (1973).The genu *Bacillus*. Handbook, No. 427. U.S. Department of Agriculture. Washington, D.C.

13. Guven, K., , M.B., Avci, O. (2006). Incidence and characterization of *Bacillus cereus* in meat and meat products consumed in turkey. Journal of Food Safety, 26; 30-40.

14. Gyoping, Z., Haizhou, L., Jing H., Yongming, Yuan., Zhiming, Y. (2008). The occurrence of Bacillus cereus, *B. thuringiensis* and *B. mycoides* in Chinese pasteurized full fat milk. International Journal of Food Microbiology, 121; 195-200.

15. Hansen, B. M., Hendriksen, N. B. (2001). Detection of enterotoxic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* Strains by PCR analysis. Applied and Environmental Microbiology, 67(1); 185–189.

16. Haque, A., Russell, N.J. (2005). Phenotypic and genotypic characterisation of *Bacillus cereus* isolates from bangladeshi rice. International Journal of Food Microbiology, 98; 23-34.

17. Hin-chung, Wong. (2011). *Bacillus cereus*. Department of Microbiology Soochow University.

18. Lund, T., Granum, P. E (1996). Characterisation of a non–haemolytic enterotoxin complex from bacillus cereus isolated after a foodborne outbreak, FEMS. Microbiol Lett, 141; 151–156.

19. Lindback, T., Fagerlund, A., Rodland, M. S., Granum, P. E. (2004). Characterization of the *Bacillus cereus* Nhe enterotoxin. Microbiology, 150; 3959–3967

20. Wijnands, LM., Dufrenne, JB., van Leusden, FM. (2002). Characterization of *Bacillus cereus*. RIVM Report, 25;09-12.

21. Mantynen, V., Lindstrom, K. (1998). A rapid PCR-based DNA test for enterotoxic *Bacillus cereus*. Applied and Environmental Microbiology, 64(5); 1634–1639.

22. Meer, RR., Baker, J., Bodyfelt, FW., Griffiths, MW. (1991). Psychotropic *Bacillus* spp. in fluid milk products: a review. J Food Prot, 54; 969-79.

23. Ngamwongsatit, P., Buasri, W., Pianariyanon, P., Pulsrikarn, C., Ohba, M., Assavanig, A. (2008). 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, 121; 352–356.

24. Ombui, J.N., Gitahi J.N., Gicheru, M.M. (2008). Direct detection of *Bacillus cereus* enterotoxin genes in food by multiplex polymerase chain reaction. International Journal of Integrative Biology, 2(3); 172-181.

25. Prub, B. M., Dietrich, R., Nibler, B., Martlbauer, E., Scherer, S. (1999). The hemolytic enterotoxin HBL is broadly distributed among species of the *Bacillus cereus* group. Applied and Environmental Microbiology, 65(12); 5436–5442.

26. Peng, H., Ford, V., Frampton, E. W., Restaino, L., Shelef, L. A., Spitz, H. (2001). Isolation and enumeration of *Bacillus cereus* from foods on a novel chromogenic plating medium. Food Microbiology, 18; 231-238.

27. Sarrias, J. A., Valero, M., Salmeron, M. C. (2002). Enumeration, isolation and characterization of *Bacillus cereus* Strains from spanish raw rice. Food Microbiology, 19; 589-595.

28. Sharma, C.S., Sharma, D. K., Gill, J.P.S., Aulakh, R.S. (2003). *Bacillus cereus* from foods in India and its of animal origin in public health significance. Acta Vet Scandinavia, 44(1); 118.

29. Spira, W. M., Goepfert, J. M. (1972). *Bacillus cereus* induced fluid accumulation in rabbit ileal loops. Applied Microbiology, 24(3); 341-348.

30. Toril Lindba, Ck., Fager L. A., Skeie Rodland, M., Granum, P.E. Characterization of the *Bacillus cereus* Nhe enterotoxin. Microbiology, 150; 3959-3967.
31. Vilas-boas, G.T., Peruca, A.P.S., Arantes, O.M.N. 2007). Biology and taxonomy of .
Bacillus cereus, Bacillus anthrasis and Bacillus thuringiensis. J. Microbiol, 53; 673-687.
32. Wijnands, LM., Dufrenne, JB., Rombouts, FM. (2006). Prevalence of potentially pathogenic *Bacillus cerus* in food commodities in the Nethelands. J. Food Prot, 69; 2587-2594.