

J. Technology and Education, Vol. 17, No. 1, pp. 35-43, 2010

研究論文

Bacillus cereus 新規株のスクリーニング およびコルテックス溶解酵素のクローニングと解析

川村 敏之*, 安田 太樹

福井工業高等専門学校物質工学科 (〒916-8507 福井県鯖江市下司町)

*kawamura@fukui-nct.ac.jp

Cloning and Analyzing of Cortex Lytic Enzyme from the novel strain of *Bacillus cereus*

Toshiyuki KAWAMURA* and Taiki YASUDA

Department of Chemistry and Biology Engineering, Fukui National College of Technology,
(Geshi-cho. Sabae-City. Fukui 916-8507, Japan)

(Received February 3, 2010; Accepted June 1, 2010)

Bacillus and *Clostridium* form endospore which enable to survive themselves from environmental stress such as high temperature and chemical damage. The endospore is covered with the cortex layer consist of thick peptidoglycan. In cooking and food manufacturing, despite the heat- treated food rarely remain the endospore and cause food poisoning.

In this study, we initially screened *Bacillus cereus* from the water of medaka breeding aquarium and cloned by sowing the LB agar plate after treatment of saturated urea solution. We isolated of genomic DNA from screened bacteria and amplified 1.4kbp DNA sequence coding 16s-rRNA by PCR. The amplified fragment was determined sequense and queried in the database . As a result of the above search, the screened bacteria showed high homology to *Bacillus cereus*.

Secondary we approach to understand the mechanism of spore germination using *B.cereus* which originally screened. The cortex lytic enzyme (CLE) is known that it drills in the cortex layer consisted thick peptidoglycan during germination. We cloned *CLE* gene from screened *B.cereus* by PCR amplification and determined the sequense. As a result of querying, the cloned CEL has high homology and several mutation with presently known.

We also cloned *CLE* gene into the arabinose-inducible vector to product recombinant CLE protein in *E.coli* . The recombinant *E.coli* produced the 70kDa protein speculative CLE. But the most of production found degradation fragment. Endospore and proteins stored in it can endure the stress, such as heat and drugs. However our study indicates that protein itself was unstable and susceptible to degradation.

Key words: *Bacillus cereus*, cortex lytic enzyme (CLE), endospore

1. 緒言

Bacillus cereus の内性胞子は、熱・放射線などに対し、強い抵抗性を持っている[1, 2, 3]。適した環境条件になると、そのシグナルを受け取り、発芽する[4]。このため、加熱処理にも関わらず、残存した胞子が食中毒や感染症などさまざまな問題を引き起こす[5, 6, 7, 8]。発芽時には、cortex lytic enzyme (CLE) がコルテックス層に穴を開ける[9, 10]。食品、薬品などで、細菌の増殖を防ぐために、卵白から単離したリゾチームを用いる。リゾチームは、グラム陽性細菌には効果を発揮しやすいが、大腸菌や緑膿菌などのグラム陰性細菌には作用しないという欠点がある。本研究では新規のペプチドグリカン溶解酵素をクローニングし、その性質を評価した。

2. 材料と方法

2-1 バクテリアのスクリーニング

Bacillus cereus 細菌をスクリーニングするため、飽和尿素溶液処理したメダカ飼育水を LB 寒天培地に播き、25°C で 2 日培養した。

2-2 バクテリアからのゲノム DNA の単離

得られたコロニーから DNA 抽出キット (ISOHAIR / NIPPON GENE) で DNA を単離した。Extraction Buffer 200 μ L、Lysis Solution 8 μ L、Protainase K 5 μ L、混合溶液に得られたコロニーを入れ、55°C で 20 分インキュベートした。その後、フェノール・クロロホルムを 200 μ L 入れ、懸濁し遠心機で 12000rpm、5 分遠心した。水相と油相に分かれた溶液の水相部分をマイクロピペットで抽出した。抽出した溶液に、3M 酢酸 Na (pH5.2) を 20 μ L、Ethachinmate 2 μ L、100%エタノール 500 μ L、を加え DNA を共沈させた。次に溶液を遠心機で 12000rpm、10 分遠心した。上澄みを棄て、70%エタノールを 500 μ L、加え遠心機で 12000rpm、5 分遠心した。

沈殿した DNA を 30 μ L TE に溶かし DNA 溶液を得た。

2-3 バクテリアの同定

DNA テンプレートから 16s-rRNA をコードする DNA 配列 (1400bp) をユニバーサルプライマーを用いた PCR により増幅し、そのシーケンスを決定し、DNA データベース DDBJ (*DNA Data Bank of Japan*) で照合して同定を行った。DNA 溶液を 2 μ L、ユニバーサルプライマーを front・reverse とともに 1 μ L、タカラバイオ社の DNA ポリメラーゼ ExTaq0.25 μ L、dNTP Mixture 4 μ L、10×Ex Taq Buffer 5 μ L を混合し、超純水で 50 μ L にメスアップした。その混合溶液を PCR 装置にセットし 94°C で 30 秒、55 度で 30 秒、72 度で 1.5 分を 35 サイクル反応させた。PCR 生成物をアガロースゲル電気泳動にかけ、16s-rRNA をコードする DNA 配列が増幅されているか確認した (図 1)。

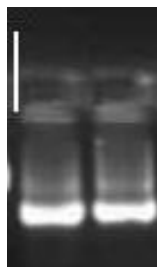


図 1 16s-rRNA の PCR 結果
左がコントロール、右が PCR 生成物である。

これを SIGMA 社の Gen Elute PCR Clean-up Kit を使用して精製後、シーケンスの解析をした。その結果、16s-rRNA をコードする DNA 配列を決定することができた (図 2)。

決定したシーケンスを DDBJ で照合したところ、*Bacillus cereus* と高い相同性を示した (図 2)。

2-4 CLE 遺伝子のクローニング

バクテリアの DNA から細胞壁溶解酵素 (CLE) 遺伝子を PCR によって増幅した。

```

Query: 494 gccgcggtaacgtaggtggcaagcgttatccggaattattgggcgtaaagcgcgcgca 553
          |||
Sbjct: 491 gccgcggtaacgtaggtggcaagcgttatccggaattattgggcgtaaagcgcgcgca 550

Query: 554 ggtggtttcttaagtctgatgtgaaagcccacggctcaaccgtggagggtcattggaaac 613
          |||
Sbjct: 551 ggtggtttcttaagtctgatgtgaaagcccacggctcaaccgtggagggtcattggaaac 610

Query: 614 tgggagacttgagtgagaagaggaaagtggaattccatgtgtagcggtgaaatgcgtag 673
          |||
Sbjct: 611 tgggagacttgagtgagaagaggaaagtggaattccatgtgtagcggtgaaatgcgtag 670

Query: 674 agatatggaggaacaccagtggcgaaggcactttctggtctgtaactgacactgaggcg 733
          |||
Sbjct: 671 agatatggaggaacaccagtggcgaaggcactttctggtctgtaactgacactgaggcg 730

Query: 734 cgaaagcgtggggagcaaacaggattagataccctggtagtccacgccgtanacgatgag 793
          |||
Sbjct: 731 cgaaagcgtggggagcaaacaggattagataccctggtagtccacgccgtaaacgatgag 790

Query: 794 tgctaagtgttagagggtttccgccctttagtgtgaagttaacgcattaagcactccgc 853
          |||
Sbjct: 791 tgctaagtgttagagggtttccgccctttagtgtgaagttaacgcattaagcactccgc 850

Query: 854 ctggggagtagcggccgcaaggctgaaactcaaaggaaatgacgggggcccgcacaagcgg 913
          |||
Sbjct: 851 ctggggagtagcggccgcaaggctgaaactcaaaggaaatgacgggggcccgcacaagcgg 910

Query: 914 tggagcatgtggttta 929
          |||
Sbjct: 911 tggagcatgtggttta 926
    
```

図2 単離したバクテリアと *Bacillus cereus* の 16s-rRNA との相同性
 Query が単離したバクテリア、Sbjct が *Bacillus* 属の 16s-rRNA を示す。

DNA 溶液を 2 μL、ユニバーサルプライマーを front・reverse とともに 1 μL、タカラバイオ社の DNA ポリメラーゼ ExTaq 0.25 μL、dNTP Mixture 4 μL、10×Ex Taq Buffer 5 μL を混合し、超純水で 50 μL

Lにメスアップした。その混合溶液をPCR装置にセットし94℃で30秒、55度で30秒、72度で1.5分を35サイクル反応させ、CLEフラグメントを得た。インビトロジェン社の pBAD Directional TOPO Expression Kit を使用して pBAD/Thio-TOPO ベクターに CLE フラグメントをライゲーションした。pBAD/Thio-TOPOベクター1 μ L、Salt Solution1 μ L、CLEフラグメント4 μ Lを混合し、25℃で一晩インキュベートした。

2-5 酵素生産大腸菌の作製

CLE 遺伝子を組み込んだプラスミドをヒートショックによってコンピテントセル(TOP10)に導入した。ライゲーション溶液 0.5 μ L、コンピテントセル 15 μ L 混合溶液を氷上に30分静置し、その後42℃で30秒熱処理をする。熱処理後、氷上で2分静置する。次にSOC培地 200 μ L 加え、37℃で1時間培養する。培養液を Amp を添加した LB プレート培地に植菌し37℃で培養した。

2-6 プラスミド抽出

得られたコロニーの大腸菌が CLE フラグメントの組み込まれたプラスミドを有しているか確認するため、アルカリ SDS 法によりプラスミドを抽出しアガロースゲル電気泳動を行った。LB 培地に組み替え大腸菌を36度で一晩前培養した。培養液を12000rpmで1分遠心し、上澄み液を棄てる。Lysis Buffer100mL ずつ加え、ボルテックスで懸濁する。アルカリ SDS を200 μ L 加え溶菌させる。

次に、3M 酢酸 Na (pH4.8) を150 μ L 加え懸濁する。12000rpm で5分間遠心し、上清を別のチューブに移す。フェノール・クロロホルム溶液を上清と等量加え、12000rpm で10分間遠心する。水相の上清を別のチューブに移し、100%エタノールを加えDNAを沈殿させる。12000rpm で5分間遠心し、上清を棄てる。さらに70%エタノールを加え懸濁し、

12000rpm で5分間遠心し、上清を棄て真空乾燥させる。乾燥後、50 μ L の TE 溶液を加えプラスミド溶液を得た。得られたプラスミド溶液とコントロールとしてなにも組み込まれていないベクターを1%アガロースゲルに注入し100V で30分電気泳動を行った。その後ゲルを取り出し、エチジウムブロマイド溶液に20分浸漬して染色した。染色後、紫外線を照射してバンドを確認した。

2-7 アラビノースによるタンパク質発現誘導

アラビノース添加による CLE の発現誘導を行い、30分ごとに OD₆₆₀ で濁度を測定し、増殖曲線を作製した。アラビノースの濃度が全体の0、0.2%となるように培養液を調整した。組み替え大腸菌を36度で一晩培養し、その培養液を50 μ L 加え LB 培地をそれぞれ4.95、4.9mL 加え、OD₆₆₀=0.5 付近まで培養したら20%アラビノースをそれぞれ0、50 μ L 加え、全体の液量を5mL とした。この培養液を36度で5.5時間培養し30分ごとに濁度を測定した。

2-8 SDS-PAGE によるタンパク質生産の確認

CLE タンパクの発現を確認するため SDS-PAGE を行った。サンプルバッファを作製するため、1M tris 1mL、1%SDS10mL、メルカプトエタノール 1mL、グリセロール 2mL、を混合し純水で20mL にメスアップし BPB1mL 加える。次に、泳動バッファを作成するため、tris9.09g、グリシン 43.23g を混合し、純水で3L にメスアップし SDS を3g 加える。前項と同様の操作で組み替え大腸菌を6時間培養し誘導をかけ、遠心して集菌する。集菌した菌体に1mL のサンプルバッファを加え、懸濁し各サンプル 10 μ L ずつとりゲルに注入する。泳動バッファを適量、泳動装置に入れ100V で2時間泳動した。マーカーとしてアルブミン溶液 1mL に1mL サンプルバッファを加えサンプルと同様に泳動した。ゲルは BIORAD 社の Ready Gels J を使用した。泳動後、ゲ

ルを容器に移し純水で十分に洗浄後クマシーブルドを確認した(図6)。
一溶液を入れ 3 時間染色し、純水で洗浄してバン

```

Query: 2  SLASKYGSTPDEIVKDGNLPAETLVVGGALIVNTKGNYYVQPGDSLRYISQTYNVPLA 181
          SLASKYGSTPDEIVKDGNLPAETLVVGGALIVNTKGNYYVQPGDSLRYISQTYNVPLA
Sbjct: 15  SLASKYGSTPDEIVKDGNLPAETLVVGGALIVNTKGNYYVQPGDSLRYISQTYNVPLA 74

Query: 182 SLAKVNNLSLKSILHVGQQLYVPKGTKRAVESIAYLQPSTIPIKESLVNATRAINPFLTY 361
          SLAKVNNLSLKSILHVGQQLYVPKGTKRAVESIAYLQPSTIPIKESLVNATRAINPFLTY
Sbjct: 75  SLAKVNNLSLKSILHVGQQLYVPKGTKRAVESIAYLQPSTIPIKESLVNATRAINPFLTY 134

Query: 362 LAYFSFEAKRDGTLKEPTETAKIANIATQGGTIPMLV
          LAYFSFEAKRDGTLKEPTETAKIANIATQGGTIPMLV
Sbjct: 135 LAYFSFEAKRDGTLKEPTETAKIANIATQGGTIPMLV

Query: 737 ITNIENGNFSADLTSVILRDATIQNKFITNILQTAEKYGMRDIHDFESVAPEDREAYNR 558
          ITNIENGNFSADLTSVILRDATIQNKFITNILQTAEKYGMRDIHDFESVAPEDREAYNR
Sbjct: 172 ITNIENGNFSADLTSVILRDATIQNKFITNILQTAEKYGMRDIHDFESVAPEDREAYNR 231

Query: 557 FLRNVKTRLPSTLSTLVPKTSNQGKGFEEAHDYKAQGGIVDFVVIIMTYDWGWQGGP 378
          FLRNVKTRLPSTLSTLVPKTSNQGKGFEEAHDYKAQGGIVDFVVIIMTYDWGWQGGP
Sbjct: 232 FLRNVKTRLPSTLSTLVPKTSNQGKGFEEAHDYKAQGGIVDFVVIIMTYDWGWQGGP 291

Query: 377 PMAISPIGPVKEVLQYAKSQMPPQKIMMGQNLVYGFWDWKLPFKQGNPPXXXXXXXXXXXXA 198
          PMAISPIGPVKEVLQYAKSQMPPQKIMMGQNLVYGFWDWKLPFKQGNPP          A
Sbjct: 292 PMAISPIGPVKEVLQYAKSQMPPQKIMMGQNLVYGFWDWKLPFKQGNPPAKAVSSVAVALA 351

Query: 197 RKYNVPIRYDFTAQAPHFNFDENGQHEVWFEDARSIQSKFNLMEQGGIGGISYWKIGL 18
          RKYNVPIRYDFTAQAPHFNFDENGQHEVWFEDARSIQSKFNLMEQGGIGGISYWKIGL
Sbjct: 352 RKYNVPIRYDFTAQAPHFNFDENGQHEVWFEDARSIQSKFNLMEQGGIGGISYWKIGL 411

Query: 17  PF 12
          PF
Sbjct: 412 PF 413
    
```

図3. クローニングした CLE のアミノ酸配列と既知の B. cereus の CLE との相同性
赤字で示した 1 2 アミノ酸が欠落している。

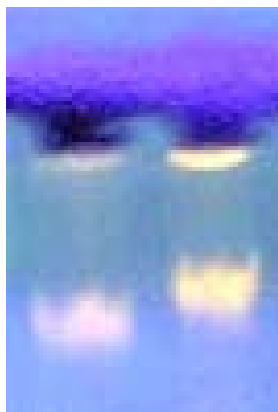


図4 組み換えプラスミドの電気泳動写真
セルフライゲーションコントロール(左)とクローン α 7 (右)

表1 濁度の変化

時間(h)	cont	①	②	③	average
0	0	0.007	0.109	0.017	0.044333
0.5	0.01	0.006	0.068	0.022	0.032
1	0.07	0.044	0.093	0.057	0.064667
1.5	0.143	0.13	0.171	0.131	0.144
2	0.274	0.286	0.323	0.303	0.304
2.5	0.478	0.472	0.507	0.492	0.490333
3	0.722	0.682	0.706	0.697	0.695
3.5	0.903	0.828	0.851	0.86	0.846333
4	1.067	0.941	0.949	0.953	0.947667
4.5	1.202	1.03	1.028	1.027	1.028333
5	1.323	1.074	1.071	1.082	1.075667
5.5	1.433	1.123	1.103	1.124	1.116667
6	1.503	1.158	1.147	1.163	1.156
6.5	1.513	1.197	1.202	1.214	1.204333
7	1.509	1.212	1.216	1.212	1.213333
7.5	1.482	1.223	1.21	1.23	1.221
8	1.476	1.251	1.261	1.252	1.254667
8.5	1.46	1.248	1.263	1.255	1.255333
9	1.465	1.262	1.25	1.264	1.258667

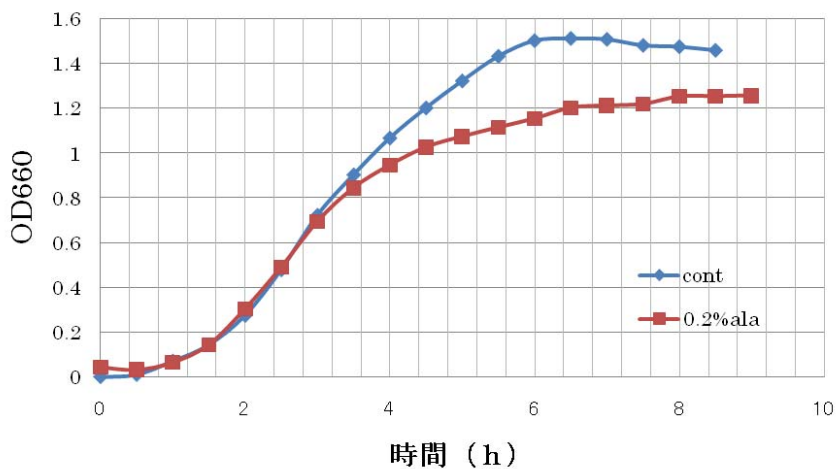


図5 増殖曲線

3. 結果

尿素処理したサンプルより 1 種類と思われるコロニーを 10 個取得した。このコロニーから DNA を抽出後、PCR によって 16s-rRNA をコードする DNA 配列を増幅し、アガロース電気泳動を行った(図 1)。その結果、16s-rRNA (1400bp) と同じ分子量のバンドを得られ、16s-rRNA をコードする DNA 配列の増幅に成功した(図 1)。

Bacillus から得られた DNA を用いて細胞壁溶解酵素 (CLE) 遺伝子のクローニングを行った (図 3)。*B. cereus* と 97% (アミノ酸で 97%)、*B. thuringiensis*, *B. anthracis* と 90% の相同性を示した。したがって、単離したバクテリアは、*B. cereus* である可能性が高い。また、*B. cereus* の CLE との比較で 339~350 番目のアミノ酸 12 個 (AKAVSSVAIVAL) が脱落しているが、他のアミノ酸は一致していることがわかった(図 3)。

PCR によって増幅した CLE フラグメントを pBAD ベクターにライゲーションし、コンピテントセルに形質転換を行ったところ、アンピシリン選択培地に 7 つのコロニーを得た。これらのコロニーを LB 液体培地で培養し、アルカリ SDS 法によってプラスミドを抽出しアガロースゲル電気泳動を行った (図 4)。その結果 7 番目のサンプル (以後 $\alpha 7$ と記述) のバンドがコントロールのベクターのみのバンドよりも上方にシフトしていた。よって CLE フラグメントのライゲーションと形質転換は成功し、アラビノース添加による CLE 酵素の発現が可能な遺伝子組み換え大腸菌を得ることができた。

得られた $\alpha 7$ 菌体を用いて、アラビノース誘導により CLE タンパク質を合成させ、同時に増殖曲線も作成した (図 5)。時間に対する濁度の変化を表 1 に示す。測定サンプルは 4 つ、アラビノース誘導をかけないものをコントロールとし、 $OD_{660}=0.5$ 付近でアラビノースを加えたものが 3 つである。今

回は培養から 2.5 時間でアラビノースを添加した。コントロールと 3 つのサンプルの平均をプロットしたものを図 5 に示す。誘導から 2 時間後から増殖が抑制され始め、4 時間後には 0.3 以上の開きができています。

CLE 酵素の発現を確認するため、SDS-PAGE でバンドを確認した。その結果を図 6 に示す。

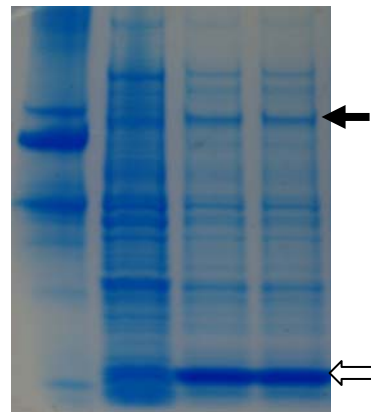


図 6 SDS-PAGE 解析

左レーンからマーカー(ウシ血清アルブミン 66kDa, 卵アルブミン 45kDa)、誘導をかけていない $\alpha 7$ 菌体、アラビノースを 0.02% の濃度で誘導をかけた $\alpha 7$ 菌体、0.2% の濃度で誘導をかけた $\alpha 7$ 菌体である。矢印(黒)は、合成したタンパク質と思われるバンド。矢印(白)は、分解産物を示す。

1 列目がアルブミンで、上方のバンドが牛の血清アルブミン (66kDa)、下方が卵白アルブミン (45kDa) である。2 列目はアラビノースを 0.02% の濃度で誘導をかけた $\alpha 7$ 菌体、3 列目が 0.2% の濃度で誘導をかけた $\alpha 7$ 菌体、4 列目が誘導をかけていない $\alpha 7$ 菌体である。誘導をかけた菌体は牛の血清アルブミンより上方の 70kDa に特異的なバンドを観察した。このバンドが目的の CLE タンパクの分子量と合致しているため、組み替え大腸菌が CLE タンパクを生産できていることが確認できた。また誘導をかけていない大腸菌と比べて全体的に

バンドが薄く、分子量の非常に小さいバンドが下方に濃くでていた。

4. 考察

Bacillus 属細菌の内性胞子の耐熱, 耐薬剤性のメカニズムを明らかにすることにより、食中毒防止などに応用できると考え、研究をスタートした。まず、*Bacillus cereus* を尿素によるスクリーニングにより行った。得られたバクテリアの 16s-rRNA の塩基配列を調べたところ既知の *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus anthracis* の 16s-rRNA と高い相同性を示し、特に *Bacillus cereus* とは 99% の相同性を示した。他のバクテリアであれば相同性 99% となるとほぼ同一の菌と判断されることが多いが、*B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis* のゲノム配列は極めて相同性が高く、特に保存性の高い 16s-rRNA が 100% の一致していても別のバクテリアである可能性がある。そこで、*Bacillus* 属特有の CLE 遺伝子の配列を調べたところ、*B. cereus* と 96% (アミノ酸で 97%)、*B. thuringiensis*, *B. anthracis* と 90% の相同性を示した。したがって、単離したバクテリアは、*B. cereus* である可能性が高い。また、*B. cereus* の CLE との比較で 339~350 番目のアミノ酸 12 個 (AKAVSSVAVAL) が脱落しているが、他のアミノ酸は一致していることがわかった。現在、見つかっている、既存の CLE は、すべて 12 アミノ酸を持っており、本研究でクローニングした CLE のみ欠落が見られた。この 12 アミノ酸が他の菌で保存性が高いことから何らかの機能を有する可能性があるが、CLE の酵素の活性領域やリガンド結合領域など分子レベルでの解析がこれまで行われておらず不明である。逆にいえば、今回発見した酵素と既存の酵素を比較することで酵素の分子レベルの機能が明らかになる可能性がある。

この CLE を組み換えた大腸菌を作製した。この

大腸菌の増殖曲線の結果からアラビノースで誘導したタンパク質の影響で大腸菌の生育を阻害することが分かった。また SDS-PAGE の結果より、生育阻害は CLE タンパクが発現していることで起こっていることが確認された。また、分解産物が多く見られることより、CLE タンパク質は極めて不安定であると考えられる。胞子中でどのように保存され活性を維持しているか、単にコレックス層に保護されているだけで安定性を保てるのか疑問である。何らかのタンパク質を安定に保つメカニズムが存在するのかもしれない。

5. 結論

Bacillus cereus の内性胞子は、熱や薬剤に強い。この内性胞子のストレス耐性メカニズムや発芽について調べることで、熱や薬剤に強いタンパク質の研究や熱耐性菌の食中毒防止を目的とし研究を行った。そのために、最初に水環境から *Bacillus cereus* をスクリーニングした。飽和尿素溶液処理したメダカ飼育水を LB 寒天培地に播き、選別した。得られた菌を同定するためゲノム DNA の単離を行い、16s-rRNA をコードする DNA 配列を PCR により増幅し、シーケンスを決定した。そのシーケンスを DNA データベース DDBJ (*DNA Data Bank of Japan*) で照合して同定を行ったところ、*Bacillus cereus* と高い相同性を示した。

Bacillus cereus のペプチドグリカン溶解酵素 (CLE) は、発芽時に分厚いペプチドグリカン層に穴を開ける。CLE の機能を明らかにすることで、胞子の発芽、食品中からの胞子除去などが可能になるかもしれない。そこで、単離、同定したバクテリアのゲノム DNA から CLE 遺伝子を PCR 法で増幅後、塩基配列を調べた。その結果、単離したバクテリアも CLE 遺伝子に相同性の高い遺伝子をもつことを明らかにした。

さらに、この遺伝子をアラビノースで発現誘導

が可能な pBAD ベクターにした。このプラスミドを遺伝子組換えにより大腸菌に導入し、アラビノースを添加することにより CLE 様タンパク質を合成する組み換え大腸菌を作製した。組み換え CLE タンパク質は、SDS-PAGE で解析すると分解産物が多数見られ、不安定なタンパク質であることが分かった。CLE タンパク質は、不安定であるにもかかわらず、胞子の中では熱などのストレスに耐性となる。コルテックス層で覆われていることで熱などに耐性となるといわれるが、極めて不安定なタンパク質がそれだけの理由で、長期間の大きなストレスにも耐え得ることから、他にタンパク質を安定化するメカニズムが示唆される。

6. 参考文献

- [1] Knaysi G. Effects of temperatures above the maximum for germination on the endospore of *Bacillus cereus*. *J Bacteriol.* 1964 May; 87(5):1129-1136.
- [2] Remsen CC, Lundgren DG, Slepecky RA. Inhibition of the development of the spore septum and membranes in *Bacillus cereus* by beta-phenethyl alcohol. *J Bacteriol.* 1966 Jan;91(1):324-331.
- [3] Kulikovskii AV. Relationship between the ultrastructure and biochemical composition of spores and their resistance to high temperature exposure and chemical agents. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol.* 1976 Jan;(1):132-134.
- [4] Raso J, Góngora-Nieto MM, Barbosa-Cánovas GV, Swanson BG. Influence of several environmental factors on the initiation of germination and inactivation of *Bacillus cereus* by high hydrostatic pressure. *Int J Food Microbiol.* 1998 Oct 20;44(1-2):125-132.
- [5] McClements JM, Patterson MF, Linton M. The effect of growth stage and growth temperature on high hydrostatic pressure inactivation of some psychrotrophic bacteria in milk. *J Food Prot.* 2001 Apr;64(4):514-522.
- [6] Stamatin N, Angheliesco S. Pathogenicity and toxicity of *Bacillus cereus*. *Ann Inst Pasteur (Paris).* 1969 Feb;116(2):210-217.
- [7] Berthelot P, Dietemann J, Fascia P, Ros A, Mallaval FO, Lucht F, Pozzetto B, Grattard F. Bacterial contamination of nonsterile disposable gloves before use. *Am J Infect Control.* 2006 Apr;34(3):128-130.
- [8] Barrie D, Hoffman PN, Wilson JA, Kramer JM. Contamination of hospital linen by *Bacillus cereus*. *Epidemiol Infect.* 1994 Oct;113(2):297-306.
- [9] Brown WC, Cuhel RL. Surface-localized cortex-lytic enzyme in spores of *Bacillus cereus* T. *J Gen Microbiol.* 1975 Dec;91(2):429-432.
- [10] Moriyama R, Kudoh S, Miyata S, Nonobe S, Hattori A, Makino S. A germination-specific spore cortex-lytic enzyme from *Bacillus cereus* spores: cloning and sequencing of the gene and molecular characterization of the enzyme. *J Bacteriol.* 1996 Sep;178(17):5330-5332.