

# فراوانی ژن px01 در باسیلوس سرئوس، باسیلوس تورنجینزیس و باسیلوس سوبتیلیس با استفاده از تکنیک SDS-PAGE

سیدحسین شاهچراغی<sup>۱</sup>، جمیله نوروژی<sup>۲</sup>، محمد جواد نمازی<sup>۳</sup>، غلامرضا جوادی<sup>۴</sup>، محمد حسن شاه حسینی<sup>۵</sup>، حسین صمدی<sup>۶</sup>، سید هادی شاهچراغی<sup>۷</sup>

<sup>۱</sup> دانشجوی مقطع کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران  
<sup>۲</sup> استاد گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال  
<sup>۳</sup> استادیار گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار  
<sup>۴</sup> دانشیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران  
<sup>۵</sup> استادیار گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهریار  
<sup>۶</sup> کارشناس ارشد تربیت بدنی، دانشگاه باهنر کرمان  
<sup>۷</sup> دانشجوی کارشناسی ارشد مهندسی فراوری مواد معدنی، دانشگاه تربیت مدرس

نشانی نویسنده مسؤول: یزد، شهرستان طبس، خیابان ۱۲ متری بازک، پلاک ۲۴۴، سید حسین شاهچراغی

Email: shahcheraghii@yahoo.com

وصول: ۸۹/۴/۲، اصلاح: ۸۹/۵/۲۰، پذیرش: ۸۹/۶/۱۷

## چکیده

**زمینه و هدف:** در بین باسیلوس‌ها، باسیلوس سرئوس، باسیلوس تورنجینزیس و باسیلوس آنتراسیس دارای اهمیت زیادی می‌باشند که از میان آن‌ها باسیلوس آنتراسیس عامل بیماری سیاه‌زخم می‌باشد. تولید توکسین در باسیلوس آنتراسیس توسط ژن px01 و پلاسمید مربوط به آن صورت می‌گیرد. اخیراً در تحقیقات نشان داده شده است که این ژن به سایر باسیلوس‌های یاد شده در فوق نیز انتقال یافته است. هدف این مطالعه جستجو و تعیین فراوانی ژن px01 در باسیلوس‌هایی به جز باسیلوس آنتراسیس می‌باشد تا در صورت وجود ژن px01 در آن‌ها بتوان از آن‌ها بدون خطر بیماری‌زایی در ساخت واکسن علیه سیاه‌زخم استفاده کرد.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه توصیفی-مقطعی، ۶۵ نمونه خاک از مناطق مختلف ایران جمع‌آوری شد و ارگانسیم‌های مورد نظر از آن نمونه‌ها جدا شدند. پس از جداسازی ارگانسیم‌ها از خاک، پروتئین‌های جدا شده از باسیلوس‌های یافت شده با استفاده از تکنیک SDS-PAGE مورد ارزیابی قرار گرفته و محدوده پروتئین‌های کد شده توسط ژن px01 در هر یک از آن‌ها بررسی و مشخص شد. داده‌ها به صورت جداول و نمودار با استفاده از نرم‌افزار Exell تلخیص شد.

**یافته‌ها:** براساس نتایج، ۱۳ باسیلوس از ۳۸ باسیلوس مطالعه شده دارای باندهای پروتئینی در ناحیه پروتئین‌های کد شده توسط ژن px01 می‌باشند که همگی این نمونه‌ها از گروه باسیلوس سرئوس بودند.

**نتیجه‌گیری:** در ایران پلاسمید px01 از باسیلوس آنتراسیس، به ۱۳ باسیلوس جدا شده از گروه باسیلوس سرئوس انتقال یافته است. (مجله دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی سبزوار، دوره ۱۷/شماره ۳ / صص ۲۰۶-۱۹۶).

**واژه‌های کلیدی:** SDS-PAGE؛ باسیلوس؛ پلاسمید px01

## مقدمه

باسیلوس‌ها باکتری‌های گرم مثبت هوازی اجباری هستند که به فراوانی در آب، خاک و هوا وجود دارند. باسیلوس آنتراسیس (*Bacillus anthracis*) عامل بیماری سیاه‌زخم می‌باشد که در جنگ‌های بیولوژیک در ساخت سلاح کاربرد داشته و دارای دو پلاسمید از نوع pXO می‌باشد که یکی تولید توکسین را عهده‌دار است (pXO1) و دیگری تولید کپسول را انجام می‌دهد (pXO2). اندازه پلاسمید pXO1 این باسیلوس 189kb و اندازه پلاسمید pXO2 آن 95kb می‌باشد. توکسین باسیلوس آنتراسیس یک پروتئین کمپلکس می‌باشد که از چند واحد آنتی‌ژنیک تشکیل شده است. این واحدها شامل آنتی‌ژن محافظت-کننده یا (Protective antigen (PA)، آنتی‌ژن کشنده یا (Lethal factor و آنتی‌ژن تورمی (Edema factor (EF می‌باشند. وزن مولکولی اختصاصی سه پروتئین فوق به ترتیب عبارتند از 82,7kD, 83kD, 88,8kD (۱).

با وجود شباهت بسیار بین باسیلوس آنتراسیس و گروه باسیلوس سرئوس تفاوت عمده بین این باسیلوس‌ها در وجود یا عدم وجود دو پلاسمید pXO1 و pXO2 می‌باشد. در هر دو پلاسمید ذکر شده، ژن‌های لازم برای کنترل بیان ژن‌های تولید توکسین و کپسول وجود دارند که این ژن‌ها شامل atx A و pag R روی پلاسمید pXO1 و acpB و acpA روی پلاسمید pXO2 می‌باشند (۲,۳).

در بررسی باسیلوس سرئوس (*Bacillus cereus*)، تعداد زیادی پلاسمید شناسایی شده اند که در این میان پلاسمیدهای کوچکتر، در مقایسه با سایر پلاسمیدها شباهت‌های بیشتری به پلاسمیدهای کوچکتر باسیلوس تورنجینزیس (*Bacillus thuringiensis*) نشان داده‌اند. یک پلاسمید به اندازه ۲۰۸Kb به نام pBc 10987، از باسیلوس سرئوس (ATCC10987) جدا شده است که غیر بیماری‌زا می‌باشد. این پلاسمید شباهت فوق‌العاده‌ای به پلاسمید pXO1 باسیلوس آنتراسیس دارد. باسیلوس‌های گروه

سرئوس به لحاظ اقتصادی و پزشکی و استفاده در دفاع بیولوژیک اهمیت دارند. این گروه حاوی ژنوم‌های کاملاً مرتبط و مشابه می‌باشند. با معلوم شدن ارتباط و تشابه ژنتیکی بین اعضای این گروه، پیشنهاد شده است تا باسیلوس آنتراسیس، باسیلوس سرئوس و باسیلوس تورنجینزیس اعضای یک گونه واحد معرفی شوند (۶-۴). در مورد فعالیت باسیلوس تورنجینزیس در برابر پشه‌هایی که به‌عنوان ناقل برای برخی از بیماری‌ها مثل مالاریا و تب زرد فعالیت می‌کنند، گزارش‌هایی ارائه شده است. فرآورده‌های به‌دست آمده از اسپور باسیلوس تورنجینزیس به‌عنوان حشره‌کش‌های خیلی مهم بیولوژیک مطرح هستند (۷).

باسیلوس سوبتیلیس (*Bacillus subtilis*) از باکتری‌هایی است که برای بررسی رشد و تمایز سلولی بسیار مناسب می‌باشد. نام‌های دیگر آن باسیلوس ناتو (*Bacillus nato*) و باسیلوس گلوبیجی (*Bacillus globigini*) می‌باشد که در ابتدا به نام باکتری ویبریو سوبتیلیس (*Vibrio subtilis*) نامیده می‌شد. معمولاً باعث بیماری در انسان نمی‌شود. دارای کلنی‌های بزرگ، مسطح و کدر به رنگ‌های صورتی، زرد یا قهوه‌ای می‌باشد (۸, ۷).

در سال ۲۰۰۸ در مطالعه‌ای توسط آندراپ و همکاران، پلاسمید بزرگی در باسیلوس سرئوس یافت شد که همان pBCXO1 بود و شبیه پلاسمید pXO1 در باسیلوس آنتراسیس نیز بود. در ضمن یک گونه از باسیلوس تورنجینزیس را نیز یافتند که محتوی پلاسمید شبیه pXO2 بود. در این آزمایشات از باسیلوس تورنجینزیس، باسیلوس سرئوس و باسیلوس میکوئیدس (*micoides Bacillus*) به تعداد یک لیزوله از هر باکتری استفاده شد (۸).

اوورا و همکاران، طی یک بررسی دریافتند که دو پلاسمید AW63 و pBT9727 در باسیلوس تورنجینزیس وجود دارند که مشابه پلاسمید pXO2 باسیلوس آنتراسیس

می‌باشند. آنالیز توالی (sequencing) مربوط به این سه پلاسمید مشخص نمود که همگی آن‌ها از یک پلاسمید کونژوگاتیو (conjugative) مشتق شده‌اند. همچنین معلوم شد که این دو پلاسمید یعنی pAW63 و pBT9727 در کُد کردن پروتئین‌های کپسول باسیلوس تورنجینزیس نقش دارند. تعداد نوزده باسیلوس تورنجینزیس در مطالعه یاد شده آزمایش شدند که از این تعداد، پنج ایزوله باسیلوس تورنجینزیس دارای هر دو پلاسمید یاد شده بوده و یکی نیز فقط محتوی پلاسمید pAW63 بود (۹).

همچنین در مطالعه‌ای توسط ذی‌اثومین و همکاران، معلوم شد که قطعه‌ای از پلاسمید pXO1 در باسیلوس آنتراسیس، باسیلوس سرئوس و باسیلوس تورنجینزیس کاملاً به یکدیگر شباهت دارند. با مطالعه یک باسیلوس دیگر از انواع باسیلوس سرئوس یعنی باسیلوس سرئوس DBT248 که در برخی کشورهای اروپایی به‌عنوان پروبیوتیک استفاده می‌شود، مشخص شد که باکتری مزبور فاقد پلاسمید pXO1 می‌باشد. در تحقیق یاد شده تعداد بیست و چهار باسیلوس سرئوس و باسیلوس تورنجینزیس را با استفاده از تکنیک Polymerase Chain Reaction (PCR) مورد بررسی قرار دادند که طی آن شش باسیلوس تورنجینزیس و دوازده باسیلوس سرئوس دارای قطعه‌ای شبیه قطعه موجود در پلاسمید pXO1 مشاهده گردید (۱۰).

همچنین در مطالعه‌ای توسط ذی‌اثومین و همکاران، معلوم شد که قطعه‌ای از پلاسمید pXO1 در باسیلوس آنتراسیس، باسیلوس سرئوس و باسیلوس تورنجینزیس کاملاً به یکدیگر شباهت دارند. با مطالعه یک باسیلوس دیگر از انواع باسیلوس سرئوس یعنی باسیلوس سرئوس DBT248 که در برخی کشورهای اروپایی به‌عنوان پروبیوتیک استفاده می‌شود، مشخص شد که باکتری مزبور فاقد پلاسمید pXO1 می‌باشد. در تحقیق یاد شده تعداد بیست و چهار باسیلوس سرئوس و باسیلوس تورنجینزیس را با استفاده از تکنیک Polymerase Chain Reaction (PCR) مورد بررسی قرار دادند که طی آن شش باسیلوس تورنجینزیس و دوازده باسیلوس سرئوس دارای قطعه‌ای شبیه قطعه موجود در پلاسمید pXO1 مشاهده گردید (۱۰).

همچنین در مطالعه‌ای توسط ذی‌اثومین و همکاران، معلوم شد که قطعه‌ای از پلاسمید pXO1 در باسیلوس آنتراسیس، باسیلوس سرئوس و باسیلوس تورنجینزیس کاملاً به یکدیگر شباهت دارند. با مطالعه یک باسیلوس دیگر از انواع باسیلوس سرئوس یعنی باسیلوس سرئوس DBT248 که در برخی کشورهای اروپایی به‌عنوان پروبیوتیک استفاده می‌شود، مشخص شد که باکتری مزبور فاقد پلاسمید pXO1 می‌باشد. در تحقیق یاد شده تعداد بیست و چهار باسیلوس سرئوس و باسیلوس تورنجینزیس را با استفاده از تکنیک Polymerase Chain Reaction (PCR) مورد بررسی قرار دادند که طی آن شش باسیلوس تورنجینزیس و دوازده باسیلوس سرئوس دارای قطعه‌ای شبیه قطعه موجود در پلاسمید pXO1 مشاهده گردید (۱۰).

هوفماستر و همکاران نیز طی مطالعه‌ای به شناسایی ژن‌های توکسین باسیلوس آنتراسیس در باسیلوس سرئوس پرداختند و به یک پلاسمید حلقوی به نام pBCXO1 با شباهت ۹۹/۶ درصدی با پلاسمید pXO1 در باسیلوس آنتراسیس رسیدند که وظیفه کد کردن توکسین باکتری را در باسیلوس سرئوس G9241 به عهده دارد (۱۱).

در مطالعه‌ای دیگر در سال ۲۰۰۶ تعداد زیادی باسیلوس سرئوس مورد بررسی قرار گرفتند که در میان پلاسمیدهای شناسایی شده، پلاسمیدهای شبیه

### مواد و روش‌ها

در این مطالعه توصیفی - مقطعی جامعه مورد بررسی شامل مناطق مختلف ایران از جمله استان‌های خوزستان، کرمانشاه، یزد، خراسان رضوی، تهران، همدان، ایلام، فارس و سمنان بود که دلیل انتخاب این نواحی وجود خاک مناطق کویری و در معرض نور خورشید بود، چرا که نور خورشید باعث از بین بردن برخی باکتری‌ها می‌شود ولی روی باکتری‌های اسپوردار مثل باسیلوس اثر ندارد. تعداد ۶۵ نمونه خاک (از بهمن تا اسفند ۱۳۸۸) از سطح و عمق سه سانتیمتری خاک در برابر نور خورشید جمع‌آوری شد. خاک‌های جمع‌آوری شده صاف شده و یک گرم از هر نمونه خاک صاف شده درون لوله در پیچ‌دار استریل که دارای ۹ میلی لیتر آب مقطر بود ریخته شد و جهت از بین رفتن باکتری‌های فاقد اسپور مدت ۲۰ دقیقه در بن ماری ۸۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شدند و سپس برای مخلوط شدن کامل خاک و آب، در دمای ۳۰°C همراه با حرکت آرام (shaking) قرار گرفتند. پس از خنک شدن، از هر سوسپانسیون نمونه‌ای بر روی محیط نوترینت آگار کشت داده شد و در دمای ۳۷°C به مدت ۴۸ ساعت نگه‌داری شد. سپس رنگ‌آمیزی گرم انجام شد.

آگار حاوی زرده تخم مرغ ۱۰ درصد استفاده شد که بیشتر برای تشخیص باسیلوس سرئوس انجام شد. از محیط MR-VP نیز برای واکنش VP کمک گرفته شد که پس از گذشت ۴۸ ساعت از کشت باکتری در این محیط، ۲ قطره هیدروکسید پتاسیم ۴۰ درصد و ۶ قطره آلفا نفتول به آن اضافه شد. در این تست، تغییر رنگ قرمز نشان-دهنده مثبت بودن تست می باشد (۱۴).

تهیه نمونه پروتئین به منظور انجام SDS-PAGE به صورت زیر انجام شد. محیط کشت باکتری را که یک شب از کشت آن گذشته بود، سانتریفوژ کرده و در محلول ساکاروز شناور نمودیم. در این روند، فرآورده های غیرضروری و پروتئین های محلول در محیط حذف و حجم کوچکی از سلول ها باقی ماند. به این سلول ها، لیزوزیم اضافه شد تا لایه پیتیدوگلايکن آن ها متلاشی شود. سپس، سلول ها به وسیله شوک اسمزی و در معرض قرار گرفتن سریع در برابر حرارت تخریب شدند. سلول های متلاشی شده، سونیکاسیون شدند. بعد دوبار عمل سانتریفوژ انجام شد، در اولین سانتریفوژ، ذرات غیرمحلول با وزن مولکولی بالا رسوب کرد (برای مثال، سلول های متلاشی نشده)، و در سانتریفوژ دومی که با سرعت بالاتری انجام شد، وزیکول های غشاء رسوب کردند. بدین ترتیب، پروتئین های محلول در مایع سطحی باقی می ماند و رسوبی هم که تشکیل می شود، مورد استفاده قرار می گیرد.

در مرحله بعد، ۱۰ میلی لیتر از کشت باکتری را که یک شب کشت داده شده بود، به مدت ۵ دقیقه به میزان ۵K سانتریفوژ کردیم. مایع سطحی را دور ریختیم. رسوب به جا مانده را در ۱۰ میلی لیتر از 30mM Tris (pH=8/1) HCl شناور ساخته و ورتکس کردیم. مجدداً سلول ها را به مدت ۱۰ دقیقه در ۵K سانتریفوژ نموده و مایع سطحی آن را دور ریختیم. رسوب را در ۲۰۰ میکرولیتر از ساکاروز ۲۰٪ در محلول 30 mM Tris HCL (pH=8/1) شناور ساخته و بعد، مخلوط را به لوله واکنش منتقل نموده و به

بعد از رنگ آمیزی گرم رنگ آمیزی اسپور شبیه روش زیل نلسون انجام شد و برای رنگ بری از اتانول استفاده شد. بدین ترتیب که فوشین غلیظ را روی لام ریخته و به مدت ۵ دقیقه حرارت داده تا بخار از آن متصاعد گردد، اما نجوشد. سپس با آب شسته شد. با افزودن اتانول، رنگ تند لام از بین رفته و رنگ قرمز ملایمی باقی ماند. سپس لام را با آب شسته و با متیلن بلو به مدت یک تا دو دقیقه پوشانده شد. آن گاه لام را شسته و کج نگاه داشته تا آب آن خارج شده و در مجاورت هوا خشک گردد. در زیر میکروسکوپ، میکروارگانیزم ها به رنگ آبی و اسپور به رنگ قرمز مشاهده شد (۱۳). در مرحله بعد، تست های بیوشیمیایی لازم به شرح جدول شماره ۱ انجام گرفتند:

تست های بیوشیمیایی برای تقسیم بندی ایزوله ها بر اساس رنگ آمیزی (جدول ۱)

تست بیوشیمی در محیط حاوی زرده انجام شد که تست لستیناز نام دارد. واکنش مثبت تست با ایجاد هاله سفید مشخص می شد.

در تست کاتالاز مقداری از کلنی با لوپ در آب اکسیژنه حل شد و واکنش مثبت با ایجاد حباب مشخص شد.

در این تست کشتی از ارگانیزم با کمک آنس، به صورت عمودی در لوله های آگار نیمه جامد تلقیح شد. در تست مثبت اطراف آنس کدورت ایجاد می شد.

۴- برای این تست از محیط MR-VP استفاده می شد. واکنش مثبت با تغییر رنگ قرمز محیط مشخص می شد (۱۴).

\*الف+: ۹۰ تا ۱۰۰ درصد از باسیلوس ها مثبت هستند.

ب(+): معمولاً مثبت ضعیف اند.

ج+ -: تا ۹۰ درصد باسیلوس ها مثبت اند.

د-: کمتر از ۱۰ درصد سویه ها مثبت می باشند.

تست همولیز نیز برای تشخیص تولید آنزیم های خارج سلولی توسط باکتری انجام شد که با مشاهده هاله ای از همولیز اطراف کلنی باکتری، مثبت بودن آن مشخص می گردد. در تست لستیناز نیز از محیط نوترینت

مدت ۲ دقیقه روی یخ قرار دادیم و ۲۰ میکرولیتر به ازای یک میلی گرم در هر میلی لیتر لیزوزیم را که در EDTA 1M ساخته شده بود، به لوله اضافه کردیم. لوله را به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ گذاشتیم. سلول‌ها را به مدت ۳۰ دقیقه یخ خشک قرار دادیم و ۱/۲۵ میلی لیتر (pH=7/3) 3mM EDTA را به آن اضافه نموده و سلول‌ها را ورتکس کردیم. محتویات لوله را به لوله سانتریفوژ منتقل کرده و سرلوله را با پارافیلیم بستیم و رسوب را به مدت دو دقیقه و ۳۴ ثانیه در معرض سونیکاسیون قرار دادیم. محتویات این لوله را به لوله واکنش جدید منتقل نموده و سلول‌ها را با سانتریفوژ کردن به مدت ۵ دقیقه در ۵K رسوب دادیم. مایع سطحی را به لوله واکنش جدید وارد نموده و رسوب را دور ریختیم. مایع سطحی یاد شده را به مدت ۱۵ دقیقه در 15K سانتریفوژ کردیم که در پی آن رسوب (ماده همراه با غشاء) و مایع سطحی (ماده محلول) تولید شد. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از مایع سطحی را به لوله واکنش جدید وارد کردیم. این عمل باید با دقت انجام شود تا رسوب به هم نخورد. به لوله حاوی ۱۰۰ میکرولیتر از مایع سطحی، ۵۰ میکرولیتر از بافر 3x LUG اضافه کردیم. این نمونه را تا زمان موردنیاز برای انجام SDS-PAGE در روی یخ نگهداری نمودیم و مایع سطحی باقی مانده را دور ریختیم. سپس رسوب مورد استفاده را در ۱۰۰ میکرولیتر از بافر 1x LUG شناور ساختیم. رسوب شناور شده که آن را به لوله واکنش انتقال داده و تا زمان موردنیاز برای انجام SDS-PAGE در روی یخ قرار دادیم. برای انجام SDS-PAGE ابتدا ژل حلال را تا دو سانتی متری ابتدای شیشه ریخته و سپس روی آن ایزوبوتانول (Isobutanol) ریختیم تا تمام حباب‌های آن خارج شده و سطح ژل صاف و یک دست گردد. بعد از این که ژل سفت شد، ایزوبوتانول را با سرازیر کردن شیشه‌ها خالی کردیم. با آب مقطر، جای ایزوبوتانول را شستشو داده و با کاغذ صافی خشک کرده، ژل بالا را ریخته و برای

ایجاد چاهک، شانه را درون ژل قرار دادیم. بعد از سفت شدن ژل، ابتدا شانه و سپس spacer پایینی را در آورده و جای spacer را با کاغذ صافی پاک کردیم. ژل را بر روی دستگاه الکتروفورز به‌طور عمودی نصب نمودیم. تانک را به آن وصل کرده، بعد بافر تانک IX را در درون تانک الکتروفورز و قسمت بالایی مربوط به ژل اضافه کردیم. قبل از افزودن نمونه به درون ژل، نمونه را به مدت ۵ دقیقه به همراه بافر نمونه جوشاندیم. مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه و همچنین از نمونه محلول به دست آمده از غشاء سلول را به درون حفره با سورنگ همیلتون تزریق نمودیم و نیز مارکر استاندارد (فرمانتاز) را با وزن‌های مولکولی معین تا 170 KDa به درون حفره جداگانه در وسط ژل وارد کردیم و دستگاه را ابتدا به ولتاژ ۸۵ و بعد از نیم ساعت به ولتاژ ۱۰۵ ولت وصل کردیم. هنگامی که رنگ جلویی (بروموفنل بلو) نزدیک به انتهای ژل رسید، عمل الکتروفورز را متوقف کردیم. ژل را به مدت یک شب در محلول رنگ‌آمیزی کوماسی بلو (comasi blue) روی روتاتور (Rotator) گذاشتیم. روز بعد، محلول رنگ‌آمیزی را با پی‌پت پاستور به آهستگی خارج ساختیم، به نحوی که به ژل آسیبی نرسد. محلول رنگ‌بر را که شامل اسیداستیک ۸ درصد و اتانول ۱۲ درصد بود، روی آن ریختیم و صبر کردیم. هر یک ساعت، محلول رنگ‌بر تازه به آن اضافه نمودیم و این عمل را آنقدر تکرار کردیم تا محلول رنگ‌بر شفاف بود و سپس از ژل عکس-برداری نمودیم (۱۵).

در این تحقیق، نیاز به انجام آزمون‌های آماری چندانی نبود ولی برای محاسبه درصدها و رسم نمودارها از نرم افزار Excell استفاده شد.

### یافته‌ها

در میان نمونه‌های جمع‌آوری شده، میزان

جدول ۱: خصوصیات افتراقی چهار گونه باسیلوس

| واکنش                             | باسیلوس       |                    |                  |
|-----------------------------------|---------------|--------------------|------------------|
|                                   | باسیلوس سرئوس | باسیلوس تورنجینزیس | باسیلوس آنتراسیس |
| واکنش زرده تخم مرغ ۱              | + الف*        | +                  | + ب*             |
| کاتالاز ۲                         | -             | +                  | +                |
| رنگ آمیزی گرم                     | +             | +                  | +                |
| حرکت ۳                            | + ج*          | - د*               | -                |
| همولیز                            |               |                    |                  |
| (گلوبول قرمز گوسفند) رشد به       | +             | +                  | -                |
| صورت کلنی های ریشه ای استفاده بی- | -             | +                  | -                |
| هوازی از گلوکز                    | +             | +                  | +                |
| واکنش ۴vp                         | +             | +                  | +                |

جدول ۲: تعداد باسیلوس های جدا شده از خاک و فراوانی نمونه های خاک به تفکیک هراستان

| فراوانی نمونه خاک | مجموع | B.            |          |        |
|-------------------|-------|---------------|----------|--------|
|                   |       | thuringiensis | subtilis | cereus |
| ۶                 | ۵     | -             | ۲        | ۳      |
| ۱۰                | ۳     | -             | ۱        | ۲      |
| ۹                 | ۱     | -             | -        | ۱      |
| ۴                 | ۴     | -             | ۱        | ۳      |
| ۷                 | ۴     | -             | ۲        | ۲      |
| ۹                 | ۵     | -             | ۲        | ۳      |
| ۱۰                | ۳     | -             | ۲        | ۱      |
| ۴                 | ۳     | -             | ۱        | ۲      |
| ۶                 | ۳     | -             | ۱        | ۲      |
| -                 | **۷   | ۳             | ۲        | ۲      |
| ۶۵                | *۳۸   | ۳             | ۱۴       | ۲۱     |

\*: تعداد کل باسیلوس های جدا شده از ۶۵ نمونه خاک کدگذاری شده و باکتری-

های اهدایی

\*\* : تعداد باسیلوس های اهدایی دو دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات و واحد تهران شمال.

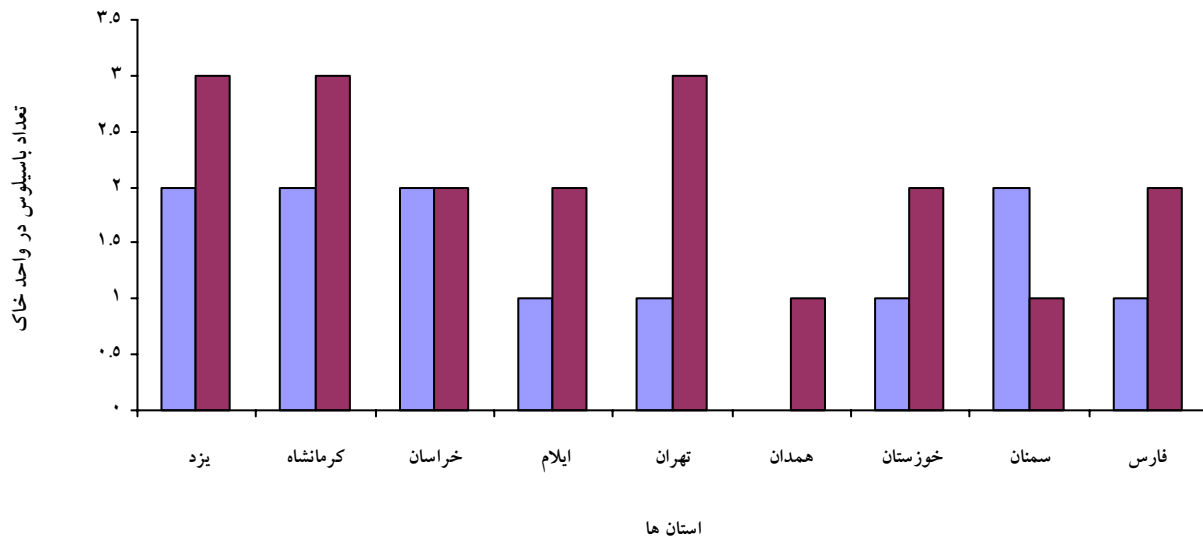
در نتایج بعد از استخراج پروتئین ها و انجام SDS-

PAGE (شکل ۱)، نکته قابل توجه این است که باندهای

باسیلوس سرئوس در سه استان یزد، کرمانشاه و تهران بالاترین میزان را داشتند که سه ایزوله باسیلوس سرئوس در هر یک از این استان ها جداسازی شد. این باسیلوس در همدان و سمنان، پایین ترین میزان را دارا بود که تعداد باسیلوس سرئوس جدا شده از خاک این دو استان تنها یک ایزوله باسیلوس سرئوس بود. در مورد باسیلوس سوبتیلیس، بالاترین درصد جداسازی در استان های کرمانشاه، یزد، خراسان و سمنان بود که تعداد دو ایزوله در هر کدام از این استان ها بود و میزان پایین جداسازی در ایلام، تهران، خوزستان و فارس مشابه بود، به نحوی که تنها یک ایزوله باسیلوس سوبتیلیس در این استان ها جدا شد. سه ایزوله باسیلوس تورنجینزیس، یک ایزوله باسیلوس سرئوس و یک ایزوله باسیلوس سوبتیلیس از بخش میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، یک ایزوله باسیلوس سرئوس و یک ایزوله باسیلوس سوبتیلیس از بخش میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات نیز دریافت شد. جدول ۲ نشان دهنده تعداد هر یک از باسیلوس های جدا شده از خاک و فراوانی نمونه های به دست آمده به تفکیک هر استان می باشد.

در نمودار ۱، توزیع باکتری های شناسایی شده از ۶۵ نمونه خاک استان های مختلف کشور نشان داده شده است. این شکل نشان می دهد که میزان باسیلوس سرئوس تفکیک شده در سه استان یزد، کرمانشاه و تهران بالاترین و در همدان و سمنان پایین ترین میزان را دارا می باشد. در مورد باسیلوس سوبتیلیس، بالاترین درصد تفکیک به ترتیب در استان های کرمانشاه، یزد، خراسان و سمنان و پایین ترین میزان تفکیک در استان های ایلام، تهران، خوزستان و فارس بود (نمودار ۱).

بیشترین باسیلوس جدا شده از خاک (تعداد کل باسیلوس جدا شده) در استان های کرمانشاه و یزد و کمترین میزان آن مربوط به استان همدان بود. تعداد کلنی های جدا شده از خاک ۳۱ ایزوله باکتری بود (نمودار ۲).



نمودار ۱: توزیع باکتری‌های شناسایی شده از ۶۵ نمونه خاک استان‌های مختلف کشور که میزان باسیلوس سرئوس تفکیک شده در سه استان یزد و کرمانشاه و تهران بالاترین و در همدان و سمنان پایین‌ترین میزان را دارا می‌باشد. در مورد باسیلوس سوبتیلیس بالاترین درصد تفکیک به ترتیب در استان‌های کرمانشاه، یزد، خراسان و سمنان و پایین‌ترین میزان تفکیک در ایلام، تهران، خوزستان و فارس بود.



نمودار ۲: توزیع کمی کلنی‌های جدا شده از خاک به تفکیک استان در شکل مشخص است که استان‌های کرمانشاه و یزد بیشترین و استان همدان کمترین تعداد کلنی باسیلوس را دارا بودند.

مربوط به استان همدان، نمونه ۸ و ۹ مربوط به استان خوزستان، نمونه ۱۰ و ۱۱ مربوط به استان فارس و نمونه ۱۲ و ۱۳ مربوط به استان کرمانشاه بود.

### بحث

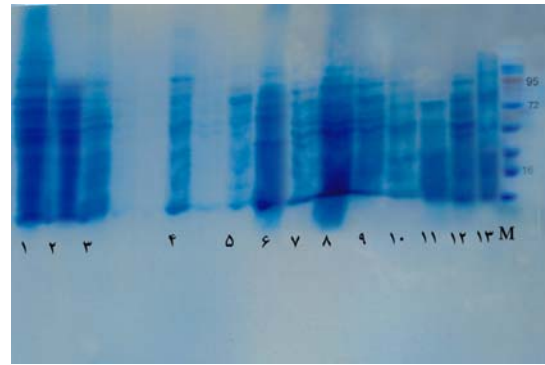
تعداد ۱۳ ایزوله باسیلوس از ۳۸ باسیلوس آزمایش شده دارای باندهای پروتئینی در ناحیه پروتئین‌های کُد شده توسط ژن pxo1 بودند. در مطالعات نشان داده شده

پروتئینی در محدوده ۷۲-۹۵ KDa در ۱۳ نمونه به وفور مشاهده شد، و چون در این باکتری‌ها محدوده پروتئین‌های مربوط به توکسین در بین این دو باند می‌باشد، می‌توان پیشنهاد نمود که ژن‌های مربوط به توکسین در پلاسמיד pxo1 در این ناحیه قرار بگیرند. از این ۱۳ نمونه باکتری، نمونه ۱ و ۲ مربوط به استان تهران، نمونه ۳ و ۴ مربوط به استان خراسان رضوی، نمونه ۵ مربوط به استان سمنان، نمونه ۶ مربوط به استان یزد، نمونه ۷

pxo1 مثبت بودند که همگی آن‌ها از باسیلوس سرئوس استخراج شده بودند.

آندراپ و همکاران در مطالعه خود به یک پلاسمید بزرگ در باسیلوس سرئوس رسیدند که pBCXO1 نامیده می‌شود که شبیه pxo1 باسیلوس آنتراسیس بود؛ همچنین یک گونه از باسیلوس تورنجیزیس را یافتند که محتوی پلاسمید شبیه pxo2 بود. در آزمایشات آن‌ها به تعداد یک نمونه از هر کدام از باسیلوس‌های تورنجیزیس، سرئوس و باسیلوس میکوتیدس استفاده شد. همچنین معلوم شد که پلاسمید جدا شده از باسیلوس تورنجیزیس از طریق الکتروفورز، اندازه‌ای در حدود ۱۲۸ kb دارد که در محدوده این باند از مارکر به کار گرفته شده قابل مشاهده بود. روش به کار رفته در آزمایش آن‌ها، برای جداسازی انواع پلاسمیدهای بزرگ، که اندازه‌ای در حدود ۳۵۰ kb دارند نیز به کار می‌رود. در تحقیق مزبور نتیجه گرفته شد که باسیلوس تورنجیزیس و باسیلوس سرئوس که در گروه سرئوس قرار دارند، محتوی پلاسمیدهای بزرگ می‌باشند. باسیلوس تورنجیزیس به کار گرفته شده از زخم‌های حاصل از جنگ جدا گردید (۸). در مطالعه حاضر نیز وجود باندهای پروتئینی مربوط به پلاسمید pxo1 مشاهده شد که این خود شاهد دیگری برای احتمال وجود پلاسمید pxo1 در باسیلوس سرئوس خواهد بود.

در مطالعه‌ای که توسط آنورا و همکاران با استفاده از تکنیک الکتروفورز انجام شد، وجود دو پلاسمید AW63 و pBT9727 در باسیلوس تورنجیزیس تأیید شد که مشابه پلاسمید pxo2 موجود در باسیلوس آنتراسیس بودند. آنالیز توالی مربوط به این سه پلاسمید فوق مشخص کرد که آن‌ها از یک پلاسمید کونژوگاتیو مشتق شده‌اند. همچنین مشخص شد که دو پلاسمید AW63 و pBT9727 نقشی در گد کردن پروتئین‌های کپسول باسیلوس تورنجیزیس دارند. تعداد نوزده ایزوله باسیلوس



شکل ۱: \*۱۳ نمونه مثبت از ایزوله‌های باسیلوس سرئوس بوده و باندهای پروتئینی در محدوده ۷۲-۹۵ KDa در آن‌ها مشخص است. در این باکتری‌ها محدوده پروتئین‌های مربوط به توکسین در بین این دو باند می‌باشد. \*M: باندهای مارکر در شکل مشخص است. این مارکر ساخت شرکت فرمنتاز (Sm0671) بوده و هفت باند که به ترتیب باندهای ۱۷۰، ۷۲، ۹۵، ۵۵، ۳۴، ۱۶ و ۱۰ کیلودالتون را ایجاد می‌کند.

است که باسیلوس سرئوس عامل دو نوع مسمومیت غذایی بوده، از باسیلوس تورنجیزیس، به‌عنوان حشره‌کش بیولوژیک استفاده می‌شود و باسیلوس سوبتیلیس به‌عنوان یک منبع تولیدکننده آنتی‌بیوتیک در صنعت مطرح است. باسیلوس آنتراسیس مولد بیماری سیاه‌زخم می‌باشد که ژن تولید سم آن در پلاسمید مربوطه، ژن pxo1 می‌باشد که خواص سمی بودن آن را نشان می‌دهد. دومین پلاسمید آن نیز یعنی pxo2 حاوی ژن‌های سنتز کپسول است که برای بیماری‌زایی این باسیلوس ضروری می‌باشند. با توجه به این‌که اخیراً برخی از مقالات انتقال ژن pxo1 از باسیلوس آنتراسیس، به باسیلوس‌های غیر آنتراسیس مورد تأکید قرار گرفته است، در مطالعه حاضر فراوانی ژن pxo1 در ایزوله‌های باسیلوس سرئوس، باسیلوس تورنجیزیس و باسیلوس سوبتیلیس با مشاهده باند پروتئینی مربوط در SDS-PAGE در ایران مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به روش پژوهش که شرح آن در بخش مواد و روش‌ها ارائه شد، نتایج حاصل از SDS-PAGE نشان داد که انتقال ژن pxo1 به سایر باسیلوس‌ها به‌جز باسیلوس آنتراسیس افزایش یافته است، به این دلیل که تعداد ۱۳ نمونه ایزوله از باسیلوس‌ها از لحاظ ژن



حدود ۹۰ درصد بودند. پلاسمیدهای pXO1 که به عنوان شاهد استفاده شدند، از سه نمونه باسیلوس آنتراسیس جدا و مورد استفاده قرار گرفتند. پس از این که این قطعات استخراج شد، اثر آن از نظر سمیت روی سلول‌های تخمدان هامستر بررسی شد که نتیجه تست‌ها عدم تأثیر آن‌ها بر روی این سلول‌ها بود. بنابراین نتیجه مطالعه آن‌ها نیز نشان داد که هر چند پلاسمید pXO1 به باسیلوس سرئوس و باسیلوس تورنجینزیس انتقال یافته است ولی به دلیل عدم وجود پلاسمید pXO2 فاقد خاصیت سمی است (۱۰). مطالعه یاد شده با نتایج تحقیقات حاضر به لحاظ نشان دادن وجود ژن pXO1 تشابه داشت.

در مطالعه‌ای دیگر که توسط هوفماستر و همکاران انجام شد ژن‌های مولد توکسین باسیلوس آنتراسیس و ژن‌های مرتبط با آن در باسیلوس سرئوس که نوعی بیماری شبیه سیاه‌زخم ایجاد می‌کند، مورد بررسی قرار گرفت. آن‌ها به یک پلاسمید با شباهت ۹۹/۶ درصدی با پلاسمید pXO1 باسیلوس آنتراسیس دست یافتند. این پلاسمید یک پلاسمید حلقوی به نام pBCXO1 می‌باشد که شباهت بالایی با پلاسمید مسؤل کُد کردن توکسین باکتری در باسیلوس آنتراسیس داشت. این پلاسمید در باسیلوس سرئوس G9241 همان وظیفه را به عهده دارد. ویروانس باسیلوس سرئوس که در تحقیق یاد شده استفاده شد، با آزمایش بر روی موش‌ها مورد تأیید قرار گرفت. در مطالعه مذکور، همولوگ بودن ژن‌های مسؤل تولید پلاسمید pXO2 با ژن‌های مسؤل کُد کردن کپسول در باسیلوس آنتراسیس مورد آزمایش قرار گرفت که تأیید نشد. از طریق آزمایشات فنوتیپی و آنالیز RNA16Sr که بر روی باسیلوس سرئوس و بر روی موش‌ها انجام شد، مشخص گردید که باسیلوس سرئوس G9241 توانایی به وجود آوردن یک بیماری شبیه آنتراکس را دارد و در شروع بیماری علایمی دقیقاً شبیه به مراحل ابتدایی ابتلا به سیاه‌زخم به وجود می‌آورد. با توجه به نتیجه مطالعه مزبور و اثبات وجود پلاسمید مشابه pXO1 و عدم وجود

تورنجینزیس در مطالعه فوق آزمایش شدند که از این تعداد، پنج ایزوله باسیلوس تورنجینزیس دارای هر دو پلاسمید یاد شده و یک ایزوله باسیلوس تورنجینزیس فقط محتوی پلاسمید pAW63 بود. شباهت بین پلاسمید pAW63 و پلاسمید pXO2 باسیلوس آنتراسیس، به مراتب بیشتر از شباهت بین pBT9727 و pXO2 باسیلوس آنتراسیس است. وجود این دو پلاسمید یعنی pAW63 و pBT9727 در باسیلوس‌های ذکر شده، نشان‌دهنده این موضوع است که در برخی از باسیلوس‌ها به ویژه اعضای گروه سرئوس، پلاسمیدهای مشابه پلاسمید توکسین و کپسول وجود دارد. در باسیلوس‌های تورنجینزیس آزمایش شده در تحقیق یاد شده، پلاسمیدی مشابه با پلاسمید کپسولی باسیلوس آنتراسیس شناسایی گردید اما این آزمایش برای یافتن پلاسمیدهای شبه توکسین در باسیلوس تورنجینزیس، نتیجه منفی داشت (۹). نتیجه آزمایشات مطالعه فوق با نتیجه کار ما از نظر وجود پلاسمید شبیه pXO1 همخوانی نداشت که دلیل آن احتمالاً عدم انتقال پلاسمید مذکور به این گروه از باسیلوس‌ها در زمان آزمایش توسط آن‌ها بوده است.

زیائومین و همکاران طی مطالعه‌ای دریافتند که قطعه‌ای از پلاسمید pXO1 در باسیلوس آنتراسیس و باسیلوس سرئوس و باسیلوس تورنجینزیس کاملاً شباهت دارند. همچنین آن‌ها نشان دادند که در باسیلوسی به نام DBT248 که از باسیلوس سرئوس به دست آمده و در کشورهای اروپایی به عنوان پروبیوتیک به کار می‌رود، پلاسمید pXO1 وجود ندارد. در تحقیق یاد شده میزان تشابه ژنتیکی تعداد بیست و چهار نمونه باسیلوس سرئوس و باسیلوس تورنجینزیس از طریق PCR مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که شش نمونه باسیلوس تورنجینزیس و دوازده نمونه باسیلوس سرئوس دارای قطعه‌ای شبیه قطعه موجود در پلاسمید pXO1 می‌باشند. این قطعه از پلاسمید pXO1 و دوازده نمونه باسیلوس سرئوس جدا شده مورد آزمایش، دارای تشابهی

پلاسمیدهای شبیه pXO1 منجر به شناسایی نواحی مرتبط با بیماری‌زایی در پلاسمیدها به خصوص، پلاسمید pCER270 شد. بر اساس نتایج به‌دست آمده از این آنالیزها پلاسمید pCER 270 مرتبط با پلاسمید pXO1 می‌باشد. لازم به تأکید است که پلاسمید pCER 270 محتوی ژن سنتز کرئولید می‌باشد.

در تحقیقات اثبات شده است که پلاسمیدهای pCER270 و pPER272 با دارا بودن ژن‌های مربوطه، در تغییرات ژنتیکی بین کروموزوم‌ها و پلاسمیدها در اعضای گروه سرئوس، نقش دارند. با توجه به توالی‌های کروموزومی گونه‌هایی که حاوی دو پلاسمید فوق می‌باشند تلاش‌ها برای کشف تشابه بین ژن‌های آن‌ها همچنان ادامه دارد. مطالعات گروه مذکور نشان داد که پلاسمید pPER272 ارتباط و تشابه زیادی با پلاسمید pBC10987 دارد. پلاسمید pPER 272 دارای یک قسمت 90 kb می‌باشد که این قسمت در پلاسمید pXO1 یافت نشده است. وجود پلاسمیدهای شبیه pXO1 در باسیلوس سرئوس در تحقیق یاد شده اثبات شد، ولی عدم بیماری‌زایی این باسیلوس‌ها علی‌رغم وجود این پلاسمیدها، ممکن است به‌خاطر نداشتن ساختار کامل pXO1 باشد (۱۲). نتایج مطالعه یاد شده تأییدکننده یافته‌های به‌دست آمده در مطالعه حاضر می‌باشد که در آن وجود پلاسمید pXO1 در باسیلوس سرئوس مورد تأیید قرار گرفته است. همچنین در ایران انتقال پلاسمید pXO1 از باسیلوس آنتراسیس به ۱۳ ایزوله باسیلوس سرئوس در آزمایشاتی که انجام شد به وقوع پیوسته است.

### تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال به‌ویژه جناب آقای دکتر اخوان به خاطر در اختیار گذاشتن برخی ایزوله‌های باسیلوس قدردانی می‌شود.

پلاسمید pXO2 در باسیلوس سرئوس G9241، شباهت آن با کار انجام شده توسط ما بسیار زیاد بود. البته در مطالعه هوفماستر کار مولکولی انجام شده و آنالیز RNA16Sr نسبت به کار انجام شده توسط ما دقیق‌تر بود چرا که در آن نوع پلاسمید شبیه pXO1 نیز مشخص شده بود (۱۱).

راسکو و همکاران در سال ۲۰۰۶، تعداد زیادی باسیلوس سرئوس و تعداد بسیاری پلاسمیدهای آن‌ها را جدا نمودند. آزمایشات آن‌ها نشان داد که پلاسمیدهای شبیه pXO1 به طور کلی اندازه‌ای حدود ۲۷۲ kb دارند و حال آن‌که خود پلاسمید pXO1، کمی از آن‌ها کوچک‌تر می‌باشد. بزرگ‌ترین پلاسمیدهای شبیه پلاسمید pXO1 شامل pPER272 و pCER270 می‌باشند. قبلاً پیش‌بینی می‌شد که اندازه پلاسمید pCER270 ۲۰۸ kb باشد، اما آزمایشات تعیین توالی نشان دادند که اندازه آن ۲۷۰ kb می‌باشد. هر دوی این پلاسمیدها، دارای ساختار موزائیکی بوده و حاوی ژن‌هایی هستند که روی کروموزوم‌های اعضای گروه سرئوس هم یافت می‌شوند. این شواهد نشان داد که پلاسمیدهای بزرگ در گروه سرئوس و اعضای آن، مانند دیگر پلاسمیدهای باکتریایی قادرند به-عنوان ناقل عمل کنند و این عمل آن‌ها برای تغییر اطلاعات ژنتیکی مؤثر است. آنالیزهایی که به‌منظور تعیین تعداد کپی پلاسمیدهای شبیه pXO1، انجام شد نشان داد که تعداد آن‌ها در هر کروموزوم ۱ تا ۳ عدد می‌باشد. تحقیقات نشان دادند که تعداد کپی‌های پلاسمید pXO1 در باسیلوس آنتراسیس از ۱۳ تا ۴۰ کپی در هر کروموزوم می‌باشد. نتایج حاصله از روش‌هایی که برای تعیین میزان کپی پلاسمیدها استفاده شدند، نشان داد که فاکتورهای مختلفی از جمله زمان و محیط رشد اهمیت بیشتری دارند. این مسأله نیز به اثبات رسید که کروموزوم‌های اعضای گروه سرئوس، خیلی شبیه یکدیگر بوده و پلاسمیدهای موجود در این اعضاء نقش مهمی در ویروانس و اکولوژی ارگانیزم‌ها دارند. آنالیز

## References

1. Amadio AF, Benintende GB, Zandomeni RO. Complete sequence of three plasmids from *Bacillus thuringiensis* environmental isolate and Comparison with related plasmids from the *Bacillus cereus* group. *Plasmid*. 2009; 172-82.
2. Delvecchio V, Connolly J, Alefantis T, Walz A, Quan M, Patra G, et al. Proteomic profiling and Identification of Immunodominant Spore Antigens of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*. *Applied Environmental Microbiology*. 2006; 72(9) P: 6355-63.
3. Koehler T M. *Bacillus anthracis* genetics and virulence gene regulation. *Current topics in microbiology and immunology*. 2002; 143-64.
4. Han CS, Xie G, Challacombe JF, Altherr MR, Bhotika SS, Bruce D, et al. Pathogenomic Sequence analysis of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolates closely related to *Bacillus anthracis*. *J Bacterio*. 2006; 188: 3382 -90.
5. Pannucci J, Okinaka R, Sabin R, Kuske C. *Bacillus anthracis* pXO1 plasmid sequence conservation among closely related bacterial species. *Journal of Bacteriology*. 2002; 184(I): 134 -41.
6. Sakai H, Howlader M, Ishida Y, Nadaguci A, Oka K, Ohbayashi K. Replacement of domain III of cry insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis*. *Journal of bioscience and bioengineering*. 2007; 103: 381-3.
7. Kim k, Seo J, Wheeler K, Park C, Kim D, Park S, et al. Rapid genotypic detection of *B.anthraxis* and the *B.cereus* group by multiplex real-time PCR melting curve analysis. *FEMS*. 2005; 301-10.
8. Andrup L, Barfod KK, Jensen GB, Smidt L. Detection of large plasmids from the *Bacillus cereus* group. *Plasmid Elsevier*. 2008; 59: 139-43.
9. Geraldine A, Andrup L, Mahillon J. Conjugative plasmid PAW63 brings new in sights into the genesis of the *B.anthraxis* Virulence plasmid pXO2. *BMC Genomics*. 2005; 1471-2164.
10. Xiaomin Hu, Munk H B, Bohse H N, Yuan Z. Detection and phylogenic analysis of one anthrax virulence plasmid pXO1 conservative ORF ubiquitous presented within *Bacillus cereus* group. *Biochemical and Biophysical Research*. 2006; 1214-9.
11. Hoffmaster AR, Chapman GD, Chute MD, Marston CK, Mayer LW, Maiden MC, et al. Identification of anthrax toxin genes in a *Bacillus cereus* associated with an illness resembling inhalation anthrax. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 2004; 101: 8449-54 .
12. Rasko DA, Rosovitz MJ, Okstad OA, Fouts DE, Jiang L, Cer RZ, et al. Complete sequence analysis of novel plasmids from emetic and periodontal *Bacillus cereus* isolates reveals a common evolutionary history among the *B. cereus*-group plasmids, including *Bacillus anthracis* pXO1. *Journal of bacteriology*. 2007; 189(1): 52.
13. Peter J, White JM. Selective isolation of *Bacillus sphaericus* from soil by use of acetate as the only major source of carbon. *Applied and Environmental Microbiology*. 1985; 1478-81.
14. Barritt M M. The intensification of the Voges-Proskauer reaction by the addition of  $\alpha$ -naphthol. *J Pathol Bacteriol*. 1936;42: 441-445.
15. Berber I. Characterization of *Bacillus* species by numerical analysis of their SDS-PAGE protein profiles. *J Cell Mol Biol*. 2004; 3: 33-7.