مجله علمی- پژوهشی زیست فناوری میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی
تابستان 1391، دوره چهارم، شماره سیزدهم، صفحه 28-21

بررسی فراوانی پلاسمید pXO در باسیلوس های غیر بیماریزا و تجدید نظر در طبقه بندی باسیلوس ها با روش PCR

حجت اله مرادی[1]، جمیله نوروزی[2]، محمد حسن شاه حسینی[3]، غلامرضا جوادی[4]، سید حسین شاهچراغی[1]

1- کارشناس ارشد میکروب شناسی ، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی
2- استاد دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، دانشکده علوم پایه، گروه میکروبیولوژی
3- دانشیار دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهر قدس، گروه میکروبیولوژی
4- دانشیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی

نویسنده مسؤول: حجت اله مرادی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه میکروبیولوژی.
hojat1361m@yahoo.com

دریافت: 91/4/10 پذیرش:91/6/29

چکیده

زمینه و هدف: *باسیلوس آنتراسیس* **عامل بیماری سیاه زخم است که دارای دو پلاسمید pXO1 و pXO2 می باشد، پلاسمید pXO1 مسئول تولید توکسین است و پلاسمید pXO2 کپسول را سنتز می کند. پلاسمید مسئول سنتز توکسین، 189 kb و پلاسمید مسئول سنتز کپسول،95kb اندازه دارند. هدف از این مطالعه بررسی حضور ژن Pxo در *باسیلوس سوبتیلیس*، *باسیلوس سروئوس* و *باسیلوس تورنژینسیس* بوده است.**

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی – مقطعی، 65 نمونه خاک از سراسر کشور جمع آوری شد سپس اسپورها از خاک جدا سازی شدند و تست های استاندارد بیوشیمیایی انجام گرفت. پس از شناسایی *باسیلوس* مورد نظر پلاسمید استخراج گردید. با کمک تکنیک PCR و استفاده از پرایمر اختصاصی برای ژن مسئول تولید توکسین در پلاسمید pXO1 و پرایمر اختصاصی برای ژن مسئول تولید کپسول در پلاسمید pXO2 مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته ها: از 65 نمونه خاک جمع آوری شده، 31 باسیلوس جدا شدند 19 مورد آنها *باسیلوس سروئوس*، 12 مورد آنها *باسیلوس سوبتیلیس* بودند و 7 باسیلوس نیز اهدایی و شامل 2 *باسیلوس سروئوس* و 2 *باسیلوس سوبتیلیس* و 3 *باسیلوس تورنژینسیس* بودند. از کل باسیلوس های جداسازی شده تنها در 13 باسیلوس سروئوس یعنی 34/2 کل باکتریها باند ژن رمزکننده توکسین (pXO1) مشاهده شد، ولی باند ژن رمز کننده کپسول (pXO2) در کل باسیلوس های مورد بررسی مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: این تحقیق نشان داد که انتقال پلاسمید pXO1 از *باسیلوس آنتراسیس* به *باسیلوس سروئوس* در ایران صورت گرفته است ولی انتقال پلاسمید pXO2 به هیچ کدام از باسیلوس های مورد بررسی صورت نگرفته بود.

واژه‌های کلیدی: PCR، *باسیلوس*، پلاسمید pXO1، پلاسمید pXO2

www.SID.ir

مقدمه

باسیلوس ها باکتری های گرم مثبت بزرگ، هوازی، میله ای شکل و تشکیل دهنده اسپور هستند که ایجاد زنجیر می نمایند. بیشتر اعضای این جنس در حالت رویشی، ساپروفیت هایی هستند که در خاک، آب و هوا به سر می برند *باسیلوس آنتراسیس* (*Bacillus anthracis*) عامل بیماری سیاه زخم است و در جنگ های بیولوژیک در ساخت سلاح کاربرد دارد. دارای دو پلاسمید pXO1 و pXO2 می باشد که پلاسمید pXO1 تولید توکسین را بر عهده دارد و اندازه آن 189kb است. پلاسمید pXO2 کپسول را تولید می کند و 95kb می باشد سه فرم بیماری سیاه زخم شامل تنفسی، گوارشی و پوستی می باشد که نوع تنفسی میزان مرگ و میر بالایی را دارد. *باسیلوس سرئوس*، باکتری بیماریزای فرصت طلب ساکن خاک و عامل دو نوع مسمومیت غذایی انسانی شامل اسهال و استفراغ و اندوفتالمیت است *باسیلوس تورنژینسیس*، حشره کش بیولوژیک و *باسیلوس سوبتیلیس* مسئول ایجاد فساد مواد غذایی بوده و بنابراین مسمومیت غذایی کمی را به وجود می آورد (1-2).

طی مطالعه ای، ژن های توکسین *باسیلوس آنتراسیس* در *باسیلوس سرئوس* مرتبط با آن که نوعی بیماری شبیه سیاه زخم ایجاد می کند، شناسایی شد و پلاسمیدی با شباهت 99/6 درصدی با پلاسمید pXO1 در *باسیلوس آنتراسیس* یافت شد. از طریق آزمایشات فنوتیپی و آنالیز PCR آن ها، روی *باسیلوس سرئوس* مطالعه شد که مشخص گردید که *باسیلوس سرئوس* G9241، توانایی به وجود آوردن نوعی بیماری شبیه سیاه زخم را دارد. این پلاسمید یک پلاسمید حلقوی به نام pBCXO1 بود که با شباهت بالا به پلاسمید مسئول کد کردن توکسین باکتری در *باسیلوس آنتراسیس*، وظیفه کد نمودن آن را در *باسیلوس سرئوس* G9241 به عهده داشت. خاصیت بیماری زایی *باسیلوس سرئوس* ذکر شده، با اثر دادن روی موش به اثبات رسید. در مطالعه آن ها همچنین روی ژن های مرتبط با تولید و کد کردن کپسول مطالعه شد که نتیجه آن این بود که تشابه این ژن ها با ژن های مسئول کد کردن کپسول در *باسیلوس آنتراسیس* به اثبات نرسید (3).

طی یک بررسی با تکنیک های مولکولی در *باسیلوس تورنژینسیس* ، دو پلاسمید pAW63، pBT9727 یافت شد که مشابه پلاسمید pXO2 *باسیلوس آنتراسیس* بود. آنالیز توالی مربوط به سه پلاسمید pAW63 pBT9727 و pXO2 نشان داد که از یک پلاسمید کونژوگاتیو مشتق شده‌اند. این دو پلاسمید، در *باسیلوس تورنژینسیس* نقش رمز کردن پروتئین های کپسول را به عهده دارند. تعداد 19 *باسیلوس تورنژینسیس* آزمایش شدند که از این تعداد، 5 *باسیلوس تورنژینسیس* دارای هر دو پلاسمید و 1 *باسیلوس تورنژینسیس* فقط دارای پلاسمید pAW63 بودند. شباهت بین پلاسمید pAW63 و پلاسمید pXO2 *باسیلوس آنتراسیس*، به مراتب بیشتر از شباهت بین pBT9727 و pXO2 *باسیلوس آنتراسیس* بود. وجود این دو پلاسمید در باسیلوس های ذکر شده، نشان دهنده این موضوع است که در برخی از باسیلوس ها به ویژه اعضای گروه *سرئوس*، پلاسمیدهای مشابه پلاسمید توکسین و کپسول وجود دارد. در *باسیلوس تورنژینسیس* آزمایش شده در تحقیق آن ها، تنها پلاسمید مشابه با پلاسمید کپسولی *باسیلوس آنتراسیس* شناسایی گردید و در مطالعه آن ها، برای یافتن پلاسمیدهای شبیه توکسین در *باسیلوس تورنژینسیس* ، نتیجه منفی داشت (4).

در مطالعه ای یک پلاسمید بزرگ در *باسیلوس سرئوس* با عنوان pBCXO1 که شبیه pXO1 *باسیلوس آنتراسیس*بود یافت شد. همچنین یک گونه از *باسیلوس تورنژینسیس* را که حاوی پلاسمیدی شبیه pXO2 بود یافت شد. در مطالعه آن ها از *باسیلوس تورنژینسیس*، *باسیلوس سرئوس* و *باسیلوس میکوئیدس* به تعداد یک نمونه از هر کدام استفاده شد. برای جداسازی انواع پلاسمیدهای بزرگ که اندازه ای در حدود 350 kb دارند، از روش جداسازی پلاسمیدهای بزرگ کمک گرفتند. در تحقیق آن ها اثبات شد که *باسیلوس تورنژینسیس* و *باسیلوس سرئوس* که در گروه *سرئوس* قرار دارند، واجد پلاسمیدهای بزرگ می باشند. وجود پلاسمیدهای بزرگ در *باسیلوس میکوئیدس* که مورد آزمایش قرار گرفت، نیز به اثبات رسید (5).

طی مطالعه ای بر روی پلاسمید pXO1 در *باسیلوس آنتراسیس* ، *باسیلوس سرئوس* و *باسیلوس تورنژینسیس* دریافت شد که قطعه ای از پلاسمید pXO1 در این باسیلوس ها کاملاً شبیه است. همچنین در یک گونه از *باسیلوس سرئوس*بنام *باسیلوس سرئوس* DBT248 که در برخی کشورهای اروپائی به عنوان پروبیوتیک بکار می رود مشخص شد که فاقد پلاسمید pXO1 می باشد. در تحقیق آن ها، تعداد 24 ایزوله *باسیلوس سرئوس* و *باسیلوس تورنژینسیس* از طریق واکنش زنجیر پلیمراز (PCR) مورد بررسی قرار گرفت. 6 *باسیلوس تورنژینسیس* و 12 *باسیلوس سرئوس* دارای قطعه ای شبیه قطعه موجود در

www.SID.ir
Archive of SID

پلاسمید pXO1 بودند. این قطعه بین پلاسمید pXO1 و 12 *باسیلوس سرئوس* جدا شده مورد آزمایش، دارای تشابهی حدود 90 درصدی بود. این پلاسمیدهای pXO1، که به عنوان شاهد استفاده شد، از 3 *باسیلوس آنتراسیس* جدا و مورد استفاده قرار گرفت. این قطعه پس از اینکه استخراج شد، اثر آن از نظر سمیت روی سلول های تخمدان هامستر بررسی شد که نتیجه آن عدم تاثیر روی این سلول ها بود. نتایج مطالعه آن ها نیز بیان می کند که احتمالا پلاسمید pXO1 به *باسیلوس سرئوس* و *باسیلوس تورنژینسیس* انتقال یافته است ولی به دلیل احتمالا عدم وجود پلاسمید pXO2، در آنها، فاقد خاصیت سمی بوده است (6). هدف از این تحقیق اثبات انتقال پلاسمید مسئول سنتز توکسین و نیز پلاسمید مسئول سنتز کپسول به ایزوله های *باسیلوس سرئوس*، *باسیلوس تورنژینسیس* و *باسیلوس سوبتیلیس* از *باسیلوس آنتراسیس*در ایران با مشاهده باند در روش PCR بود.

روش بررسی

تعداد 65 نمونه خاک از عمق سه تا ده سانتیمتری خاک مناطق مختلف ایران شامل استان های کرمانشاه ، تهران ، یزد، خراسان رضوی، خوزستان، همدان، ایلام، سمنان و فارس جمع آوری شد. خاک ها پس ازجمع آوری صاف و الک گردیدند و یک گرم از هر نمونه خاک درون لوله در پیچدار که حاوی 9 میلی لیتر آب مقطر بود ریخته شد و مدت 20 دقیقه در بن ماری 80 درجه سانتی‌گراد حرارت داده شدند و پس از خنک شدن، از هر سوسپانسیون بر روی یک محیط نوترینت اگار کشت داده شد و در دمای 37°C به مدت 48 ساعت نگهداری شد. سپس رنگ آمیزی گرم و رنگ آمیزی اسپور انجام شد. در مرحله بعد تست های بیوشیمیایی شامل تست هیدرولیز نشاسته، ووگس پروسکائر (VP)، تست سیترات، تست لستیناز ، تست کاتالاز، تست حرکت ، تست حساسیت به پنی‌سیلین ، تست همولیز، تست احیای نیترات و رشد در محیط حاوی 6/5 درصد نمک طعام انجام شد(7-9).

آماده سازی پلاسمید pXO برای انجام PCR: 50 میکرولیتر از آب مقطر استریل در لوله اپندروف استریل ریخته شد. از نمونه مورد نظر چند کلنی به آب مقطر دیونیزه تلقیح و سوسپانسیون تهیه شد.50 میکرولیتر از روغن معدنی بر روی سوسپانسیون میکروبی ریخته و به مدت 20 دقیقه در حمام آب جوش حرارت داده شد. سپس نمونه جوشانده شده به مدت 10 دقیقه در 10000 rpm سانتریفوژ، و لایه بین روغن معدنی و رسوب، جدا شده و برای PCR مورد استفاده قرار گرفت.

جدول1. پرایمرهای مورد استفاده جهت مشخص نمودن حضور پلاسمیدهای pXO1 و pXO2 (10و11).

Target		Sequence 5'–3'	Product size
Protective antigen (PA)	PA 1	TCC-TAA-CAC-TAA-CGA-AGT-CG	596 bp
	PA 2	GAG-GTA-GAA-GGA-TAT-ACG- GT	
Capsule	Cap1	CTG-AGC-CAT-TAA-TCG-ATA-TG	846 bp
	Cap2	TCC-CAC-TTA-CGT-AAT-CTG-AG	

2/5 میکرولیتر PCR buffer × 10، 0/5میکرولیتر 10 mM dNTPs، 1 میکرولیتر Primer forward، 1 میکرولیتر Primer reverse، 0/4 میکرولیتر Taq DNA polymerase، 0/75 میکرولیتر 50 mM MgCl، 13/85 میکرولیتر H2O 5 میکرولیتر plasmid DNA در لوله های اپندروف 0/2 استریل ریخته شد. سپس مخلوط واکنش به مدت 5 ثانیه سانتریفوژ و در دستگاه ترموسایکلر قرار گرفت. برنامه ترموسایکلر با استفاده از نمودار حرارتی زیر تنظیم شد. 1x 94°C برای 2 دقیقه، 35x 94°C برای 30 ثانیه، 55°C 35x برای 30 ثانیه، 72 °C 35x برای 30 ثانیه، 72°C1x برای 7 دقیقه و سپس سرد کردن در 4°C. آنالیز محصول PCR با الکتروفورز بر روی ژل آگاروز 2 درصد و رنگ آمیزی با اتیدیوم برماید انجام شد.

یافته ها

در رنگ آمیزی گرم، باسیل ها به صورت میله ای و به رنگ بنفش در زیر میکروسکوپ مشاهده شدند. در رنگ آمیزی اسپور، شده سلول های رویشی به رنگ قرمز، و اسپورها گرد و یا بیضی و به رنگ سبز مشاهده شدند. نتیجه تست های بیوشیمیایی به این صورت بود که در تست کاتالاز، ایجاد حباب های سریع و ماندگار با حالت جوش زدن و در تست رشد در 6/5% نمک طعام، تغییر رنگ محیط از صورتی به زرد و در

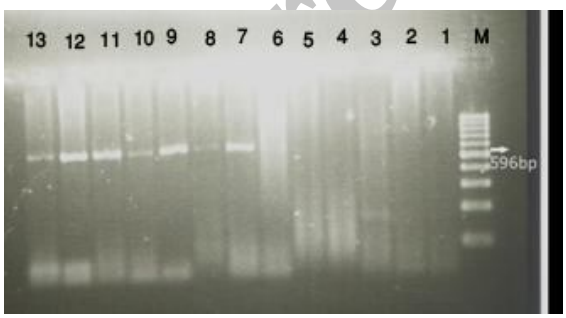
Archive of SID
www.SID.ir

تست بررسی حرکت، پخش شدن آن در مسیر خط کشت به اطراف و کدر نمودن محیط و در تست احیای نیترات، ایجاد رنگ قرمز در عرض 1 تا 3 دقیقه پس از اضافه کردن معرف اسید سولفانیلیک و آلفانفتیل آمین و در تست هیدرولیز نشاسته، ایجاد هاله بی رنگ اطراف کلنی های پس از افزودن ید و در تست VP ایجاد واکنش و تولید رنگ قرمز در مدت 15 دقیقه یا بیشتر پس از افزودن معرف و در تست لستیناز، مشاهده کدورت سفید مات در اطراف کلنی ها و در تست سیترات، ایجاد رنگ آبی و در تست حساسیت به پنی سیلین، ایجاد هاله عدم رشد و در تست همولیز، ایجاد منطقه شفاف اطراف کلنی بیانگر مثبت بودن تست ها بود. از 65 نمونه خاک جدا شده از مناطق مختلف ایران، 31 باسیلوس جداسازی شد. 1 *باسیلوس سرئوس*، 1 *باسیلوس سوبتیلیس* و 1 *باسیلوس تورنژینسیس* از واحد تهران شمال و همچنین 1 *باسیلوس سرئوس*، 1 *باسیلوس سوبتیلیس* و 2 *باسیلوس تورنژینسیس* از طرف آزمایشگاه دانشگاه علوم و تحقیقات برای انجام این تحقیق اهدا شد. در مجموع 38 *باسیلوس سرئوس*، *باسیلوس سوبتیلیس* و *باسیلوس تورنژینسیس* برای انجام این تحقیق استفاده شد که از این تعداد 21 *باسیلوس سرئوس*، 14 *باسیلوس سوبتیلیس* و 3 *باسیلوس تورنژینسیس* بود. بیشترین نمونه ها از خاک استان های کرمانشاه، یزد و تهران جدا شدند که مربوط به *باسیلوس سرئوس* و به تعداد 3 نمونه از هر استان بود. بیشترین جداسازی باسیلوس از خاک، مربوط به *باسیلوس سرئوس* به تعداد 19 *باسیلوس سرئوس* با 49/64 درصد بود و مجموع درصد *باسیلوس سرئوس* و *باسیلوس سوبتیلیس* جدا شده در استان های کرمانشاه و یزد با 13/25 درصد بیشترین و کمترین مجموع درصد *باسیلوس سرئوس* و *باسیلوس سوبتیلیس* مربوط به خاک استان همدان با 2/63 درصد بود.

نتایج حاصل از انجام الکتروفورز بعد از PCR : پس از استخراج پلاسمید ها و انجام PCR برای پلاسمید pXO1 در 21 *باسیلوس سرئوس* نشان داد که 13 *باسیلوس سرئوس* در 596bp دارای باند هستند. این باند، که باند ژن تولید کننده توکسین در پلاسمید pXO1 است، مشخص می کند *باسیلوس سرئوس* دارای پلاسمید pXO1 هستند. انجام PCR برای پلاسمید pXO1 در 8 *باسیلوس سرئوس*، 14 *باسیلوس سوبتیلیس* و 3 *باسیلوس تورنژینسیس* نشان داد که هیچ کدام برای ژن تولید کننده توکسین در پلاسمید pXO1 دارای باند نبودند. انجام PCR برای پلاسمید pXO2 در 21 *باسیلوس سرئوس*، 14 *باسیلوس سوبتیلیس* و 3 *باسیلوس تورنژینسیس* نشان داد که هیچ کدام برای ژن تولید کننده کپسول در پلاسمید pXO2 دارای باند نبودند.

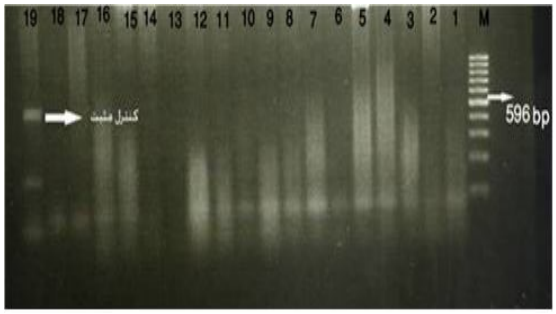
جدول 2. تعداد باسیلوس های جدا شده از خاک و فراوانی نمونه های خاک هر استان

نوع باکتری / نام استان	*B. cereus*		*B. subtilis*		*B. thuringiensis*		مجموع	
کرمانشاه	3	%7,89	2	%5,36	-	-	5	%13,25
ایلام	2	%5,36	1	%2,63	-	-	3	%7,99
همدان	1	%2,63	-	-	-	-	1	%2,63
تهران	3	%7,89	1	%2,63	-	-	4	%10,52
خراسان رضوی	2	%5,36	2	%5,36	-	-	4	%10,72
یزد	3	%7,89	2	%5,36	-	-	5	%13,25
سمنان	1	%2,63	2	%5,36	-	-	3	%7,99
خوزستان	2	%5,36	1	%2,63	-	-	3	%7,99
فارس	2	%5,36	1	%2,63	-	-	3	%7,99
اهدایی	2	%5,36	2	%5,36	3	%7,894	7	%18,61
کل	21	%55,263	14	%36,842	3	%7,894	38	%100



شکل 1. شماره 1 تا 13 نمونه *B. cereus* ، شماره های ۸،۹،۱۰،۱۱،۱۲،۱۳،۷ دارای پلاسمید pXO1، M سایزمارکر 100bp DNA ladder size marker فرمنتاس

Archive of SID
www.SID.ir



شکل 2. مارکر(M) 100bp، شماره های 1 تا 18 *B. cereus* ، *B. subtilis* و *B. thuringiensis* فاقد پلاسمید pXO1 . شماره 19 نمونه *B. anthracis* (کنترل مثبت)

شکل 3. مارکر(M) 100bp . شماره 1 نمونه *B. anthracis* (کنترل مثبت)، شماره 2 تا 9 *B. cereus* ، *B. subtilis* و *B. thuringiensis* فاقد پلاسمید pXO2

بحث

باسیلوس آنتراسیس دارای دو پلاسمید pXO1 و pXO2 می باشد، پلاسمید pXO1 حاوی ژن‌های توکسین است و باعث ایجاد خاصیت سمی آن می‌گردد. دومین پلاسمید آن pXO2 حاوی ژن‌های سنتز کننده کپسول است، که برای خاصیت بیماریزائی این باکتری ها ضروری می‌باشد. با توجه به اینکه در برخی از مطالعات اخیر، ژن تولید توکسین و ژن تولید کپسول به باسیلوس‌های دیگر به خصوص *باسیلوس سرئوس* انتقال یافته است، وجود پلاسمید pXO1 و pXO2 در *باسیلوس سرئوس*، *باسیلوس سوبتیلیس* و *باسیلوس تورنژینسیس* با مشاهده باند در روش PCR در مورد باسیلوس‌های مذکور در ایران بررسی شد. از 38 نمونه آزمایش شده، در 13 *باسیلوس سرئوس* باند مربوط به ژن تولید کننده توکسین در پلاسمید pXO1 در PCR مشاهده شد. ولی باند ژن تولید کننده کپسول در پلاسمید pXO2 در کل باسیلوس های مورد بررسی مشاهده نشد.

در مطالعه اندروپ و همکارانش، یک پلاسمید بزرگ در *باسیلوس سرئوس* با عنوان pBCXO1 که شبیه pXO1 *باسیلوس آنتراسیس* بود یافت شد. همچنین یک گونه از *باسیلوس تورنژینسیس* را که حاوی پلاسمیدی شبیه pXO2 بود یافت شد. در مطالعه آن ها از *باسیلوس تورنژینسیس*، *باسیلوس سرئوس* و *باسیلوس میکوئیدس* به تعداد یک نمونه از هر کدام استفاده شد. برای جداسازی انواع پلاسمیدهای بزرگ که اندازه ای در حدود 350 kb دارند، از روش جداسازی پلاسمیدهای بزرگ کمک گرفتند. در تحقیق آن ها اثبات شد که *باسیلوس تورنژینسیس* و *باسیلوس سرئوس* که در گروه سرئوس قرار دارند، واجد پلاسمیدهای بزرگ می باشند. وجود پلاسمیدهای بزرگ در *باسیلوس میکوئیدس* که مورد آزمایش قرار گرفت، به اثبات رسید. *باسیلوس تورنژینسیس* که روی آن مطالعه شد، از زخم های حاصل از جنگ جدا گردید. نتایج به دست آمده در مطالعه با نتایج مطالعه حاضر که وجود پلاسمید شبیه pXO1 *باسیلوس آنتراسیس* در *باسیلوس سرئوس* را اثبات نموده همخوانی داشت. همچنین نتایج به دست آمده در مطالعه آن ها با نتایج مطالعه حاضر برای اثبات وجود پلاسمید شبیه pXO2 *باسیلوس آنتراسیس* در *باسیلوس تورنژینسیس* همخوانی نداشت (5).

در مطالعه راسکو و همکارانش، بررسی ژنوم *باسیلوس سرئوس* 10987 انجام شد و آن را تعیین توالی کردند و پس از آنالیز و غربالگری PCR و مقایسه با *باسیلوس آنتراسیس* و *باسیلوس سرئوس* 14579، مشخص شد که پلاسمیدی شبیه pXO1 در *باسیلوس سرئوس* 10987 وجود دارد که یک سری از عوامل را می تواند رمز گذاری کند. این پلاسمید حدود 208kb اندازه داشت، در حالی که اندازه pXO1 *باسیلوس آنتراسیس* 189kb بود. نتایج مطالعه آن ها نشان داد که پلاسمید pXO1 *باسیلوس آنتراسیس* حدود 40% با پلاسمید مشابه در *باسیلوس سرئوس* 10987، یکسان است. مطالعه آن ها، نتیجه جالب دیگری هم داشت و آن این بود که *باسیلوس سرئوس* 10987 دارای یک پلاسمید بزرگ و واحد (pBc10987) بود، حال آنکه با وجود این پلاسمید که رمزگذاری کننده توکسین و عوامل تهاجمی باکتری است، این باکتری فاقد قدرت بیماری زایی بود. این مسئله و عدم بیماری زایی این گونه از *باسیلوس سرئوس* باعث گردید تا از این گونه به عنوان مدلی برای بررسی بیولوژی پلاسمید *باسیلوس آنتراسیس* استفاده شود. در این مطالعه، با توجه به شباهت پروتئین ها و نوکلئوتیدها بین پلاسمیدهای pBc10987 و pXO1، دریافت شد که این دو

Archive of SID
www.SID.ir

پلاسمید ممکن است اعضای یک گروه پلاسمید های دارای نسخه پایین باشند. پلاسمید یافت شده در *باسیلوس سرئوس* در این مطالعه احتمالاً به دلیل عدم وجود ژن های کپسولی فاقد توانایی برای بیماری زایی است و وجود پلاسمیدهای شبیه pXO1 یا پروتئین های مرتبط با آن در مطالعه ما نیز تأیید شد (12).

در مطالعه الینبرگ و همکارانش، انتقال DNA با واسطه پلاسمیدهای کونژوگاتیو بزرگ بین اعضاء گروه سرئوس مورد بررسی قرار گرفت و نشان داده شد که به وسیله انتقال پلاسمید از *باسیلوس آنتراسیس* به سایر اعضاء گروه ایجاد گردیده است. این مطالعه نشان داد که پلاسمیدها بین اعضای گروه سرئوس، انتقال می یابند و در نتیجه، این انتقال باعث می گردد تا خصوصیات مربوط به پلاسمید انتقال یافته (خاصیت بیماری زایی) به اعضای دیگر گروه نیز منتقل شود. در این مطالعه روی 16 باسیلوس از اعضای این گروه مطالعه شد که پلاسمیدهای قابل انتقال از 7 باسیلوس جدا و گزارش شد. این 7 باسیلوس، *باسیلوس تورنژینسیس* و *باسیلوس سرئوس* بودند که پلاسمیدهایی با اندازه 128 kb در آن ها وجود داشت و مقایسه آن با پلاسمیدهای *باسیلوس آنتراسیس* در الکتروفورز نشان که این پلاسمیدها با پلاسمید pXO1 *باسیلوس آنتراسیس* شباهت حدود 85 درصدی داشت. این تحقیق نشان داد که با توجه به شباهت پلاسمیدهای کونژوگاتیو، با پلاسمیدpXO1 *باسیلوس آنتراسیس*، پلاسمید pXO1 احتمالاً کونژوگاتیو است. با توجه به نتیجه مثبت 43 درصدی در این مطالعه و نیز وجود *باسیلوس سرئوس* در بین باکتری های مثبت از نظر پلاسمیدهای فوق و با توجه به نتایج مثبت 34 درصدی مطالعه حاضر و نیز مقایسه آن با این بررسی می توان نتیجه گرفت که انتقال پلاسمیدpXO1 از *باسیلوس آنتراسیس* به *باسیلوس سرئوس* نیز در ایران صورت گرفته است (13).

جداسازی نمونه های *باسیلوس سرئوس* G9241 و *باسیلوس سرئوس* 03BB102 و *باسیلوس سرئوس* 03BB108 از شمپانزه و گوریل که در اثر بیماری شبیه سیاه زخم مرده بودند همچنین ایجاد بیماری شبیه سیاه زخم توسط *باسیلوس سرئوس* ZK در حیوانات و اثبات وجود دو پلاسمید pXO1 و pXO2 در *باسیلوس سرئوس* و *باسیلوس تورنژینسیس* و عدم محدود بودن به *باسیلوس آنتراسیس*، این حقیقت را که پلاسمیدها به آسانی انتقال داده می شوند یا از دست می روند معیاری غیر قابل قبول برای اهداف طبقه بندی هستند. اگر یک پلاسمید در *باسیلوس آنتراسیس* از بین برود از *باسیلوس سرئوس* غیر قابل تشخیص می شود، و به عنوان *باسیلوس سرئوس* وانمود می کند. به علاوه جداسازی گونه های *باسیلوس سرئوس* که دارای پلاسمید pXO1 با یک کپسول جدید هستند و ایجاد بیماری شبیه سیاه زخم می کنند می توانند به عنوان *باسیلوس آنتراسیس* وانمود کنند و این ها را برای طبقه بندی نامناسب می سازد. کشفیات اخیر نشان داده است که گونه هایی را که باعث بیماری شبیه سیاه زخم شده اند باید مثل *باسیلوس سرئوس* و *باسیلوس آنتراسیس* تعریف و نامگذاری شوند تا اینکه ارتباط وابسته به تکامل و ویژگیهای فنوتیپی به طور محکم برقرار شود این نامگذاری دو مزیت دارد: اول: اجتناب از سردرگمی مربوط به عوامل زیاد بیولوژیکی تشخیص داده شده دوم: به روز کردن اطلاعات از طریق پایگاه های اطلاعات علمی و نشریه ها و تشخیص درست وجود ژن های توکسین سیاه زخم در باسیلوس های غیر *باسیلوس آنتراسیس* نشان می دهد که بیماری شبیه سیاه زخم را می تواند ایجاد کنند. بنابراین نبایستی تنها به تشخیص سریع عوامل شناخته شده پیشین بسنده نمود بلکه باید به قدر کافی سرعت شناخت و پاسخ به دیگر عوامل را در نظر داشت و مراکز کنترل و جلوگیری از بیماری آمادگی کافی را برای نظارت و مراقبت داشته باشند. از آنجایی که وجود این ژن های بیماری زا در *باسیلوس سرئوس*، سیستم دسته بندی عوامل بیماریزا را به چالش خواهد کشاند پس چنین سیستم های دسته بندی، برای انتقال ژن که در طبیعت به وفور اتفاق می افتد و می تواند تعداد نامعلوم از گونه های جدید و ترکیبات مختلف را ایجاد کند باید مورد توجه قرار گیرد. امکان دارد از *باسیلوس آنتراسیس* مهندسی ژنتیک شده در جنگ بیولوژیک استفاده شود که احتمالاً از انتقال ژن های pXO1 و pXO2 به سایر باسیلوس ها استفاده می کنند، پس می توان از باسیلوس های غیر بیماری زا که حاوی ژن های pXO1 و pXO2 هستند و یا با انتقال این ژن ها به باسیلوس های غیر بیماری زا صورت گرفته است برای تهیه واکسن جهت مبارزه دفاعی اقدام نمود.

نتیجه گیری

پلاسمید pXO1 حاوی ژن‌های توکسین می باشد که از *باسیلوس آنتراسیس* به *باسیلوس سرئوس*انتقال پیدا کرده است اما پلاسمید pXO2 که حاوی ژن‌های سنتز کننده کپسول می باشد و برای خاصیت بیماریزایی این باکتری ها ضروری

Archive of SID
www.SID.ir

است را هنوز ندارند و بیماری زا نیستند، از این رو توجه جدی به این مسئله لازم است.

تشکر و قدردانی

از جناب آقای دکتر حزین و پرسنل محترم آزمایشگاه پارس شهرستان سرپل زهاب که در انجام این پژوهش ما را یاری نمودند صمیمانه تشکر می شود.

References

1. Delvecchio V, Connolly j, Alefantis T, Walz A, Quan M, Patra G. *Proteomic profiling and Identification of Immunodominant Spore Antigens of Bacillus anthracis, Bacillus cereus, Bacillus thuringiensis* .AEM. 2006; 72(9): 6355-63.
2. 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.
3. Hoffmaster A, Hill K, Gee J, Marston CB, Popovic T, Sue D, Wilkins P, Avashia S, Drumgoole R, Helma C, Ticknor L, Okinaka R, Jackson J. "*Characterization of Bacillus cereus isolates associated with fatal pneumonias: strains Are closely related to Bacillus anthracis and Harbor B. anthracis Virulence*." JCM. 2006; 44(9). 3352-3360.
4. Van der AuweraGA, Mahillon J. *Transcriptional analysis of the conjugative plasmid pAW63 from Bacillus thuringiensis*. Plasmid. 2008; 60:190-199.
5. Andrup L, Barfod KK, Jensen GB, Smidt L. *Detection of large plasmids from the Bacillus cereus group*. Plasmid Elsevier. 2008; 59:139 -43.
6. Hu XB, Hansen M, Yuan Z, Johansen JE, Eilenberg J, Hendriksen L, Smidt NB, Jensen GB. *Transfer and expression of the mosquitocidal plasmid pBtoxis in Bacillus cereus group strains*. FEMS Microbiol.Lett 2005; 245:239–247.
7. 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; 214-9.
8. Hoffmaster AR, Chapman GD, Chute MD, Marston CK, Mayer LW, Maiden MC. *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.
9. Rasko DA, Rosovitz MJ, Okstad OA, Fouts DE, Jiang L, Cer RZ. *Comple 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.
15. Beyer W, Glockner P, Otto J, Bohm *A. nested PCR and DN amplification-fingerprinting method for detection and identification of Bacillus anthracis in soil samples from former tanneries*. Salisbury Med. Bull. 1996; No. 87, Special Suppl 47–49.
16. Hutson RA., Duggleby CJ, Lowe JR, Manchee RJ, Turnbull PCB. *The development and assessment of DNA and oligonucleotide probes for the specific detection of Bacillus anthracis*. Appl Bacteriol. 1993; 75, 463–472.
17. Rasko D, Ravel J, Okstad OA, HelgasonE, Cer R, Jiang L, Shores KA, Fouts D, Tourasse N. Angiuoli S, Kolonay J, Nelson W, Kolsto A, Fraser C, Read TD. *The genome sequence of Bacillus cereus ATCC 10987 reveals metabolic adaptations and a large plasmid related to Bacillus anthracis pXO1*. Nucleic Acids Research. 2004; 32(3): 977–988.
14. Eilenberg J, Hansen BM, Hu X, Hendriksen NB, Smidt L, Yuan Z, Jensen GB. *Conjugative transfer, stability and expression of a plasmid encoding a cry1Ac gene in Bacillus cereus group strains*. FEMS Microbiol. Lett. 2004; 231:45–52.

Archive of SID

www.SID.ir