

Usefulness of Bacteriological Tests and *sspE* PCR for Identification of *Bacillus cereus* Group

Sung-Hoon Kang, Ki-Jeong Kim, Won-Yong Kim and Sang-In Chung*

Department of Microbiology, College of Medicine, Chung-Ang University, Seoul, 156-756, Republic of Korea

Received : April 13, 2008

Revised : April 22, 2008

Accepted : April 29, 2008

The *Bacillus cereus* group includes *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. weihenstephanensis*, *B. pseudomycooides*. The members of *B. cereus* group shares strong degree of DNA sequence similarity. Even though the biochemical test and bacteriological test have been used to identify the *B. cereus* group, an accurate identification system of the *B. cereus* group is required. We have developed a highly specific PCR-based assay for the *B. cereus* group chromosome using a sequence motif found within a spore structural gene (*sspE*). Using the assay, we were able to discriminate *B. anthracis* from the other members of *B. cereus* group. We also tried to find a new system for the *B. cereus* group identification. Five bacteriological tests (hemolysis, motility, penicillin susceptibility, rhizoid growth, toxic crystal formation), API system (API 50CHB & API 20E), MLST and *sspE* PCR were performed on 28 strains of the *B. cereus* group. The dendrogram generated from API system and bacteriological tests revealed that *B. cereus* and *B. thuringiensis* are grouped into the same cluster. In combination of *sspE* PCR and bacteriological tests, the dendrogram showed that 4 strains of *B. cereus* clustered within the same group. *B. thuringiensis* formed the subgroup in the same cluster. All strains of *B. mycoides* were encompassed together. Another cluster only included *B. anthracis*. The best system was determined to be *sspE* PCR and bacteriological tests. It is concluded that *sspE* PCR and bacteriological tests could be used for rapid discrimination and identification of *B. anthracis* and provided an effective means of differentiation between the *B. cereus* group.

Key Words: *Bacillus cereus* group, Identification, *sspE* PCR, Bacteriological tests

서 론

Bacillus 속은 아포를 형성하는 그람양성 간균이며 공기 중이나 토양, 물, 먼지 등에 광범위하게 분포한다 (8, 28). *Bacillus* 속에는 사람, 동물에 병원성을 나타내는 *B. anthracis*와 *B. cereus*, 곤충류에 병원성이 있는 *B. thuringiensis*, 그리고 *B. mycoides*, *B. weihenstephanensis* (17), *B. pseudomycooides* (24)가 포함되며, 이 세균들은 높은 유전

적 상동성으로 인하여 *B. cereus* group으로 분류된다. 따라서 *B. cereus* group의 정확한 동정의 필요성이 항상 존재하였다.

B. cereus group 세균을 분류·동정하기 위하여 세균학적 특징과 생화학적 검사가 사용되고 있다 (26). 세균학적 방법은 집락형태, 용혈능, 페니실린감수성, 운동성, 결정체 독소 유무를 이용하는데 (8,23,26,28), 이 방법들은 각 실험실에서 간단하게 수행할 수 있으나, 배양조건에 따라 결과의 표준화가 어려우며, 돌연변이 세균에 대한 동정이 어렵다는 단점이 있다. 생화학적 방법을 이용한 API System은 편의성과 재현성으로 인해 현재 많이 이용되고 있다 (5,18,19,20). 그러나 이전의 연구에 따르면 API System은 유전학적 상동성이 높은 *B. cereus* group 세균들을 명확하게 분류·동정하기에는 미흡한 것으로 보

*Corresponding author: Sang-In Chung, Department of Microbiology, College of Medicine, Chung-Ang University, Seoul, 156-756, Republic of Korea.

Phone: +82-2-820-5661, Fax: +82-2-813-5495

e-mail: sichung@cau.ac.kr

**This work was supported in part by Chung-Ang University (2006).

고되었다 (19). 그래서 생화학적 방법과 세균학적 특성을 동시에 고려하는 것이 현재 *B. cereus* group 세균을 분류·동정하는 일반적인 방법이다.

미생물 분류 동정에 있어서 분자생물학적 접근이 시도되고 있지만, *B. cereus* group의 경우에는 고도의 유전적 상동성으로 전체 유전체 핵산 혼성화법 (whole genome DNA hybridization), 16S와 23S rRNA 염기서열 비교, 16 S-23 S operon, gyrB-gyrA 사이 부분 등에 대한 염기서열 분석, pulse-field 겔 전기영동 분석, 제한효소 절단 분석 등의 방법들은 만족할 만한 결과를 얻지 못하였다 (3,4, 6,13,27). 다만, *B. anthracis*의 신속한 검출을 위한 중합효소연쇄반응 진단법들이 개발되었는데, 독성과 관련된 두 개의 플라스미드 (pXO1, pXO2), 그리고 염색체에 존재하는 *Ba813*, gyrase B(*gyrB*), *vrroA* 유전자와 같은 특이 표지들을 검출하는데 목적을 두었다 (2,25,29,30). 그러나, 플라스미드는 실험실 또는 자연에서 전혀 다른 균종에 전달되거나 상실하기도 하며 (9), *B. anthracis* 유사 균종들이 *B. anthracis* 플라스미드 (pXO1, pXO2)와 매우 유사한 염기서열을 보유하고 있는 경우가 보고되었다 (21). 또한, 염색체 유전자를 이용한 경우에도 위양성이 보고되었다 (15). 그리고 세균의 분류·동정에 여러 DNA 단편들의 염기서열을 비교하는 multilocus sequence typing (MLST) 기법이 이용되고 있다 (11,14,21). 현재 이 기법은 더욱 향상된 변별력과 범용성 및 재현성 측면에서 많은 장점을 보인다 (7,22). 최근 *B. cereus* group에 대한 연구에서, 세균학적 특징이 *B. anthracis*와 유사한 *B. cereus*에 대하여 MLST, multiple-locus variable number tandem repeat analysis (MLVA) 실험이 수행되었는데 *B. cereus*가 *B. anthracis* 그룹에 포함되는 위양성 결과를 나타내었고, 이 연구에서는 다른 추가 실험을 통해 MLST의 분류·동정 능력을 보완하는 것이 필요함을 강조하고 있다 (10,21). 또한 MLST는 긴 분석 시간이 요구되고, 다른 분류·동정법에 비교하여 비용이 많이 드는 단점이 있다 (7,22).

본 연구의 선행 연구에서 *B. cereus* group에서 *B. anthracis*를 정확하게 구별할 수 있는 *sspE* 중합효소연쇄반응을 보고하였다 (15). 즉, *sspE* 중합효소연쇄반응으로 *B. anthracis*에서는 188 bp와 71 bp 증폭 산물을 얻은 반면에, 그 외 *B. cereus* group에서는 오직 71 bp만이 생산되어 구별이 가능하였다. *sspE* 유전자는 아포 관련 유전자로 *Bacillus* 속 중에서 *B. cereus* group만이 가지고 있다. 그래서 이를 이용하면 독성 플라스미드가 손실되어도

*B. anthracis*의 동정이 가능하다.

현재 미생물 분류에서 그 유용성이 알려져 사용되는 것이 여러 가지 검사를 종합한 다상분류법이다. 그러므로 *B. cereus* group 동정에는 세균학적, 생화학적, 분자생물학적 검사 결과를 종합적으로 고려하는 것이 동정을 위한 정확한 자료를 제공할 것으로 생각한다.

이 연구에서는 *B. cereus* group 세균에 대한 동정 과정을 정확하고, 비교적 간편하게 수행할 수 있는 방법을 찾기 위하여, 일부 표준균주에 대해 세균학적 특성 조사, API system (API 50CHB & API 20E) 검사를 실행하였다. 그리고 분자생물학적 방법으로 *sspE* 중합효소연쇄반응을 실행하였다. 각 검사 결과를 분석하고, 종합하여 동정의 정확성을 비교하였다. 특히 현재 *B. cereus* group 세균 동정에 이용되고 있는 생화학적, 세균학적 방법과 비교하였다. 비교 방법은 여러 검사 결과를 토대로 계통수를 작성하여, 표준균주 각 균종들이 같은 그룹을 형성하는 지를 조사하였다.

재료 및 방법

1. 실험균주

이 실험에는 중앙대학교 의과대학 미생물학교실에서 보존하고 있는 *B. cereus* group 28균주가 사용되었다 (Table 1). 5주의 *B. cereus*, 6주의 *B. thuringiensis*, 5주의 *B. mycoides*, 8주의 미동정 *Bacillus* (*Bacillus* spp.), 4주의 *B. anthracis*가 사용되었다. 미동정 *Bacillus* 균주 중 003, 9727, IB, III, IIIBL, IIIBS, IV는 파스퇴르 연구소 (프랑스, 파리)로부터 기증받았고, Rho 균주는 1986년 전라남도 신안군 신도에서 동물과 사람이 원인불명의 급성 질병으로 사망하였을 때 역학조사팀에 의하여 *B. anthracis*로 분리·동정되었으나, 실험동물에 대하여 병원성이 없기 때문에 *B. anthracis*가 아닌 것으로 판명된 것이다 (1).

2. 배양 및 세균학적 검사

모든 실험균주는 trypticase soy agar (Difco, Sparks, MD, USA) 평판에 순수분리배양법으로 37°C에서 18시간 배양하여 평활한 단일집락을 선발한 후 영양한천배지에 계대 배양하여 4°C 냉장고에 보존하면서 실험에 사용하였다. 모든 배양 및 세균학적 검사는 기록사항을 제외하고 모두 Bergey's Manual (28)과 *B. cereus* group의 감별 동정을 위한 미생물 분석 방법 (26)에 따라 시행하였다. 세균

Table 1. The *B. cereus* group strains examined in this study

Species and strain	Origin
<i>B. anthracis</i> (4 strains)	
<i>B. anthracis</i> Sterne 34-F2	vaccine strain (pXO1 ⁺ pXO2 ⁻)
<i>B. anthracis</i> Pasteur #2	vaccine strain (pXO1 ⁻ pXO2 ⁻)
<i>B. anthracis</i> ATCC 14185	pXO1 ⁺ pXO2 ⁻
<i>B. anthracis</i> ATCC 14186	pXO1 ⁺ pXO2 ⁻
<i>B. thuringiensis</i> (6 strains)	
<i>B. thuringiensis</i> BGSC 4AB1	<i>B. thuringiensis</i> subsp. morrisoni
<i>B. thuringiensis</i> BGSC 4AJ1	<i>B. thuringiensis</i> subsp. monterrey
<i>B. thuringiensis</i> BGSC 4AQ1	<i>B. thuringiensis</i> subsp. seoulensis
<i>B. thuringiensis</i> BGSC 4AS1	<i>B. thuringiensis</i> subsp. oswaldocruzi
<i>B. thuringiensis</i> BGSC 4CC1	<i>B. thuringiensis</i> subsp. pulsiensis
<i>B. thuringiensis</i> DSM 2046	<i>B. thuringiensis</i> Berliner 1915AL
<i>B. cereus</i> (5 strains)	
<i>B. cereus</i> KCTC 3624	Type strain
<i>B. cereus</i> BGSC 6E1	Wild type isolate
<i>B. cereus</i> KCTC 1014	From turkey and chicken manure
<i>B. cereus</i> KCTC 1094	From soil, Japan
<i>B. cereus</i> KCTC 3062	From sheep rumen
<i>B. mycoides</i> (5 strains)	
<i>B. mycoides</i> ATCC 10206	<i>B. mycoides</i> Fiugge
<i>B. mycoides</i> ATCC 21929	From soil, New Guinea
<i>B. mycoides</i> ATCC 23258	From soil
<i>B. mycoides</i> KCCM 40260	From soil, New Guinea
<i>B. mycoides</i> KCTC 3453	From soil
Unknow <i>Bacillus</i> spp. (8 strain)	
<i>Bacillus</i> spp. IB	Wild type isolate Iraq
<i>Bacillus</i> spp. 003	Wild type isolate Iraq
<i>Bacillus</i> spp. 9727	Wild type isolate Sarajevo
<i>Bacillus</i> spp. IV	Wild type isolate
<i>Bacillus</i> spp. III	Wild type isolate Iraq
<i>Bacillus</i> spp. III BL	Wild type isolate
<i>Bacillus</i> spp. III BS	Wild type isolate
<i>Bacillus</i> spp. Rho	Patient isolate, Korea 1988

ATCC, American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA

BGSC, Bacillus Genetic Stock Center, Department of Biochemistry, The Ohio State University, Columbus, OH, USA

DSM, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Germany

학적 검사로는 용혈능, 운동성, 페니실린감수성, 결정체 독소 확인을 하였다.

3. API system을 이용한 세균 동정

1) API 50CHB, API 20E 검사

API 50CHB 검사는 제조회사 (BioMerieux Co, Durham,

Table 2. Nucleotide sequences of the primers for the *sspE* gene PCR in this study

Loci	Primers	Products (bp) ^a	Sequence (5' → 3')
<i>sspE</i> (Chromosome)	<i>sspE</i> -F1	188, 71	GAGAAAGATGAGTAAAAACAACAA
	<i>sspE</i> -R1		CATTGTGCTTTGAATGCTAG

^a Boldface, *B. anthracis* specific amplicons, ^b Calculated by the nearest-neighbor method

* Source of primers originated from our previous report (Kim et al., 2005)

NC, USA) 방법을 따라 수행하였다. 순수분리한 각각의 실험균주를 영양한천배지에 접종하여 37°C에서 18시간 배양 후 준비된 API 50CHB 배지에 McFarland 2가 되도록 탁도를 맞추었다. 탁도를 맞춘 API 50CHB 배지를 API 50CHB 스트립의 튜브에 분주하고 공기와의 접촉을 막기 위해 mineral oil을 첨가한 후 30°C에서 24시간, 48시간 배양하였다. 결과 판정은 배양 후 노란색으로 나타나면 양성 (+)으로, 붉은색으로 나타나면 음성 (-)으로 판정하였다.

2) 세균 동정

실험 결과를 양성으로 판독하고, API 웹사이트 (<https://apiweb.biomerieux.com/>)에 있는 세균 동정용 프로그램 (API 50CHB v.4.0)을 이용하여 동정하였다.

4. *sspE* 중합효소연쇄반응

1) Genomic DNA의 분리

Genomic DNA의 분리는 Kim et al., (15)의 방법에 준하여 실시하였다. 37°C Brain Heart Infusion agar (Difco)에서 18시간 배양한 실험균주를 440 µl의 TE buffer (pH 8.0)에 잘 용해하고 15 µl lysozyme (100 mg/ml)을 가하여 37°C에서 1시간 반응시켰다. 반응 균체는 12.5 µl의 20% sodium dodecyl sulfate와 12 µl의 proteinase K (10 mg/ml)를 가하여 60°C에서 3시간 반응시키고 15 µl RNase A (10 mg/ml)와 20 µl NaCl (5M)을 가하여 잘 혼합한 후 다시 실온에서 20분간 방치하였다. 방치 후 동량의 phenol/chloroform/isoamylalcohol (25:24:1) 용액을 가하여 5분간 진탕한 다음 25°C 15,000 rpm에서 10분간 원침한 후 상등액만을 새로운 튜브로 옮겼다. 여기에 2배의 100% ethanol을 가하여 genomic DNA를 침전시켰다. 침전된 genomic DNA는 4°C에서 15,000 rpm으로 10분간 원침 후 상등액을 버리고 건조한 후 200 µl의 EB 완충액에 완전히 용해하였다. 정제한 DNA는 spectrophotometer (Model MBA, Perkin-Elmer, Norwalk, CN, USA)를 사용하여 260 nm에서 정량하였고 평균증류수로 100 µg/µl의 농도로 희석하여 -20°C

에 보존하면서 실험에 사용하였다.

2) Primers

사용된 primer들은 Kim et al., (15)에서 고안된 것을 사용하였다 (Table 2). 각 primer는 100 µM scale로 합성하였고 10 µM로 희석하여 -20°C에 보관하면서 실험에 사용하였다. 예상 결과는 188 bp, 71 bp 두 밴드이다.

3) 중합효소연쇄반응

중합효소연쇄반응은 Kim et al., (14)의 방법에 따랐다. 반응 혼합물의 조성은 총 25 µl에 40 ng의 주형 DNA, 0.5 µM의 각 primer, 200 µM dNTPs, 2.5 µl의 10× Taq buffer, 1.5 mM의 MgCl₂와 1 U의 Super-Therm GOLD DNA polymerase (Hoffman-LaRoche., NJ, Nutley, USA)가 함유되도록 하였다. 증폭은 96-well GeneAmp PCR system 2700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 이용하여 처음에 95°C에서 10분간 변성 후 처음 95°C 30초, 56°C 30초, 72°C 30초로 35회 반복하고 마지막으로 72°C에서 7분간 신장반응을 한번 함으로써 중합효소연쇄반응 증폭 과정을 종료하였다. 증폭 산물의 5 µl를 1 µl의 6× 젤 로딩 버퍼와 혼합 후 0.5 µg/ml의 ethidium bromide가 포함된 2% (w/v) 아가로스 젤 (Ultrapure agarose, Invitrogen Corp., CA, USA)에 로딩하여 1× TAE 버퍼 (0.04M Tris-acetate, 0.001M EDTA, pH 8.0)안에서 전극사이의 젤 길이 cm당 50V의 고정 전압하에서 전기영동을 50분간 수행하였다. DNA 증폭 산물은 Gel Doc 2000 system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 이용하여 증폭 유무 및 크기를 관찰하였다.

5. 검사 결과를 이용한 계통수 분석

이 연구에 사용된 각 검사 결과를 START v1.0.8 소프트웨어를 사용하여 쌍간거리 행렬도 (pairwise distance)를 제작하고 (12), 이를 MEGA 3.1 software에 입력하여 Unweighted Pair Group Method with Arithmetic means (UPGMA)를 이용하여 세균의 표현형에 대한 유사도를 바탕으로 계통수를 작성하였다 (16).

B. cereus group에 대한 여러 가지 검사 결과를 종합하여 작성한 계통수에서 표준균주의 각 균종들이 같은 그룹을 형성한다면, 그 동정 및 분류 과정이 적절하다는 증거라고 생각하여 계통수를 작성하였다.

6. MLST와의 계통수 비교

저자들의 이전 연구 결과 중 본 연구에 사용된 28균주들에 대한 MLST 결과 (14)로 계통수를 그렸는데, 각 균주의 allelic profile을 근간으로 쌍간거리 행렬도를 제작하

고 이를 MEGA 3.1 software에 입력하여 UPGMA 기법을 이용하여 계통수를 제작하였다 (16).

결 과

1. 세균학적 성상

B. cereus group 실험균 28주의 염색형태, 배양특성 및 세균학적 성상의 차이를 조사한 결과는 Table 3와 같다. 즉, 영양한천배지에서 증식된 *B. anthracis* (Sterne 34-F2,

Table 3. Cultural and biological properties of *B. cereus* group in this study

		Hemoysis	Penicillin	Rhizoid growth	Motility	Toxin crystals
<i>B. anthracis</i>	Sterne 34 F2	-	+(19.2 mm)	-	-	-
	Pasteure #2	-	+(18.0 mm)	-	-	-
	ATCC14185	-	+(19.8 mm)	-	-	-
	ATCC14186	-	+(20.2 mm)	-	-	-
<i>B. thuringiensis</i>	BGSC 4AB1	+	-	-	+	+
	BGSC 4AJ1	+	-	-	+	+
	BGSC 4AQ1	+	-	-	+	+
	BGSC 4AS1	+	-	-	+	+
	BGSC 4CC1	+	-	-	+	+
	DMS 2046	+	-	-	+	+
<i>B. cereus</i>	KCTC 3624	+	-	-	+	-
	BGSC 6E1	+	-	-	+	-
	KCTC 1014	+	-	-	+	-
	KCTC 1094	+	-	-	-	-
	KCTC 3062	+	-	-	+	-
<i>B. mycoides</i>	ATCC 10206	+	+(14.2 mm)	+	-	-
	ATCC 21929	+	-	+	-	-
	ATCC 23258	+	-	+	-	-
	KCCM 40260	+	-	+	-	-
	KCTC 3453	+	-	+	-	-
Unknow <i>Bacillus</i> spp.	<i>Bacillus</i> spp. 18	+	-	-	+	-
	<i>Bacillus</i> spp. 003	+	-	-	+	-
	<i>Bacillus</i> spp. 9727	+	-	-	+	-
	<i>Bacillus</i> spp. IV	+	-	-	+	-
	<i>Bacillus</i> spp. III	+	-	-	+	-
	<i>Bacillus</i> spp. III BL	+	-	-	+	-
	<i>Bacillus</i> spp. III BS	+	-	-	+	-
	<i>Bacillus</i> spp. Rho	-	-	-	-	-

Table 4. Identification Result of 28 strains by API system

Strain	Using API 50CHB			Using API 50CHB and API 20E			
	Identification	% ID	T Index	Identification	% ID	T Index	
<i>B. anthracis</i>	Sterne 34 F2	<i>B. cereus</i> 1	57.6	1	<i>B. cereus</i> 1	43.8	0.92
		<i>B. anthracis</i>	32.9	0.97	<i>B. anthracis</i>	43.5	0.89
	Pasteure #2	<i>B. cereus</i> 1	89.0	0.68	<i>B. cereus</i> 1	82.2	0.66
		<i>B. mycoides</i>	9.9	0.57	<i>B. mycoides</i>	16.3	0.62
	ATCC14185	<i>B. cereus</i> 1	57.6	1	<i>B. cereus</i> 1	43.8	0.92
		<i>B. anthracis</i>	32.9	0.97	<i>B. anthracis</i>	43.5	0.89
ATCC14186	<i>B. cereus</i> 1	57.6	1	<i>B. cereus</i> 1	43.8	0.92	
	<i>B. anthracis</i>	32.9	0.97	<i>B. anthracis</i>	43.5	0.89	
<i>B. thuringiensis</i>	BGSC 4AB1	<i>B. cereus</i> 1	97.4	0.99	<i>B. cereus</i> 1	98.4	0.94
	BGSC 4AJ1	<i>B. cereus</i> 1	99.0	0.95	<i>B. cereus</i> 1	98.0	0.85
	BGSC 4AQ1	<i>B. cereus</i> 1	99.6	0.75	<i>B. cereus</i> 1	99.8	0.74
	BGSC 4AS1	<i>B. cereus</i> 1	90.7	0.77	<i>B. cereus</i> 1	91.1	0.73
					<i>B. mycoides</i>	6.2	0.65
	BGSC 4CC1	<i>B. cereus</i> 1	88.2	0.81	<i>B. cereus</i> 1	84.7	0.76
		<i>B. mycoides</i>	16.2	0.72	<i>B. mycoides</i>	15.0	0.71
	DMS 2046	<i>B. cereus</i> 1 Low discrimination	51.6	0.44	<i>B. cereus</i> 1 good identification	98.9	0.49
<i>B. lentus</i>		34.7	0.73				
<i>B. cereus</i>	KCTC 3624	<i>B. cereus</i> 1	57.6	1	<i>B. cereus</i> 1	86.8	0.92
		<i>B. anthracis</i>	32.9	0.97	<i>B. mycoides</i>	12.5	0.87
	BGSC 6E1	<i>B. cereus</i> 1	91.2	0.87	<i>B. cereus</i> 1	85.7	0.81
		<i>B. anthracis</i>	8.2	0.75	<i>B. anthracis</i>	13.3	0.71
	KCTC 1014	<i>B. cereus</i> 1	93.3	0.94	<i>B. cereus</i> 1	93.8	0.75
		<i>B. anthracis</i>	6.4	0.82			
KCTC 1094	<i>B. cereus</i> 1	99.0	0.95	<i>B. cereus</i> 1	99.3	0.68	
KCTC 3062	<i>B. cereus</i> 1	94.7	0.95	<i>B. cereus</i> 1	90.5	0.79	
				<i>B. mycoides</i>	9.4	0.73	
<i>B. mycoides</i>	ATCC 10206	<i>B. mycoides</i>	67.7	0.78	<i>B. mycoides</i>	99.0	0.76
		<i>B. cereus</i> 2	30.9	0.76			
	ATCC 21929	<i>B. mycoides</i>	46.3	0.94	<i>B. mycoides</i>	51.6	0.92
		<i>B. anthracis</i>	30.7	0.93	<i>B. anthracis</i>	33.5	0.86
	ATCC 23258	<i>B. mycoides</i>	46.3	0.94	<i>B. mycoides</i>	51.6	0.92
		<i>B. anthracis</i>	30.7	0.93	<i>B. anthracis</i>	33.5	0.86
	KCCM 40260	<i>B. mycoides</i>	46.3	0.94	<i>B. mycoides</i>	51.6	0.92
		<i>B. anthracis</i>	30.7	0.93	<i>B. anthracis</i>	33.5	0.86
KCTC 3453	<i>B. mycoides</i>	46.3	0.94	<i>B. mycoides</i>	46.5	0.74	
	<i>B. anthracis</i>	30.7	0.93	<i>B. anthracis</i>	26.3	0.67	

Table 4. Continued

Strain	Using API 50CHB			Using API 50CHB and API 20E		
	Identification	% ID	T Index	Identification	% ID	T Index
<i>Bacillus</i> spp. 1B	<i>B. cereus</i> 1	72.3	0.78	<i>B. cereus</i> 1	87.6	0.74
	<i>B. anthracis</i>	18.6	0.72	<i>B. mycooides</i>	6.5	0.66
<i>Bacillus</i> spp. 003	<i>B. anthracis</i>	45.1	0.79	<i>B. cereus</i> 1	58.2	0.74
	<i>B. cereus</i> 1	32.5	0.79	<i>B. mycooides</i>	27.2	0.73
<i>Bacillus</i> spp. 9727	<i>B. cereus</i> 1	99.1	0.96	<i>B. cereus</i> 1	99.2	0.88
<i>Bacillus</i> spp. IV	<i>B. cereus</i> 1	72.3	0.78	<i>B. cereus</i> 1	87.6	0.74
	<i>B. anthracis</i>	18.6	0.72	<i>B. mycooides</i>	6.5	0.66
Unknown <i>Bacillus</i> spp.	<i>B. cereus</i> 1	72.3	0.78	<i>B. cereus</i> 1	87.6	0.74
	<i>B. anthracis</i>	18.6	0.72	<i>B. mycooides</i>	6.5	0.66
<i>Bacillus</i> spp. III BL	<i>B. cereus</i> 1	72.3	0.78	<i>B. cereus</i> 1	87.6	0.74
	<i>B. anthracis</i>	18.6	0.72	<i>B. mycooides</i>	6.5	0.66
<i>Bacillus</i> spp. III BS	<i>B. cereus</i> 1	72.3	0.78	<i>B. cereus</i> 1	87.6	0.74
	<i>B. anthracis</i>	18.6	0.72	<i>B. mycooides</i>	6.5	0.66
<i>Bacillus</i> spp. Rho	<i>B. cereus</i> 1	85.8	0.99	<i>B. cereus</i> 1 Low discrimination	76.7	0.91
	<i>B. mycooides</i>	12.7	0.89	<i>B. mycooides</i>	20.2	0.88

Pasteur No.2, ATCC 14185, ATCC 14186)의 집락은 모두 회백색의 거친 조면형을 나타내었고, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, 미동정 *Bacillus* 균들도 회백색의 거친 조면형을 나타내어, 모두 전형적인 *Bacillus* 속의 집락형태를 보였다. 이 중 *B. mycooides*는 특징적으로 나무뿌리 모양으로 배지 위를 퍼져나가면서 증식하여 다른 세균들과는 명확하게 구별이 가능하였다.

실험균 28주 모두 그람 염색에서 양성을 보였으며, 전형적인 간균의 형태를 나타내었다.

혈액한천배지에서 *B. anthracis* 4종은 모두 비용혈성이었으며, 미동정 *Bacillus* 중 Rho 균주 1주만이 비용혈성을 보였고, 나머지 23주는 모두 완전 용혈을 나타내었다.

운동성을 조사한 결과, *B. anthracis* 4주 (100%)와 *B. mycooides* 5주 (100%) 모두 비운동성이었고, 미동정 *Bacillus* 중 Rho가 유일하게 운동성이 없었다. *B. cereus*는 *B. cereus* KCTC 1094를 제외하고 모두 운동성이 있었으며, *B. thuringiensis*는 모두 운동성을 나타내었다.

Penicillin G에 대한 감수성 시험에서 *B. anthracis*는 모두 감수성 (18.8 mm~20.2 mm)을 나타냈으며 *B. mycooides* ATCC 10206 (14.2 mm) 1주를 제외한 실험균 모두 내성을

나타내었다.

결정체 독소 확인 시험에서 *B. thuringiensis* 6주에서 모두 독소를 확인할 수 있었고, *B. thuringiensis*를 제외한 다른 균주들은 결정체 독소를 형성하지 않았다.

표준균주에 대한 세균학적 검사에서 일부 검사가 기대하던 결과와 일치하지 않았기에 세균학적 검사만으로 *B. cereus* group의 정확한 동정은 불가능함을 알았다.

2. API System 세균 동정 결과

API system으로부터 얻은 결과를 <https://apiweb.biomerieux.com>의 동정용 프로그램에 입력하여 세균을 동정하였다 (Table 4). API 50CHB만을 사용하여 동정하였을 경우와 API 50CHB와 API 20E를 함께 사용하였을 경우의 동정 결과를 표시하였다.

1) 표준균주 동정 결과

B. anthracis 4균주에서 API 50CHB만을 사용하였을 경우, 1순위 동정은 *B. cereus*로, 2순위 동정은 *B. anthracis*로 나타내었다. T index (표준균주에 대한 전형성)는 0.75 이상으로 높았지만, similarity에서는 60% 미만으로 낮았다. 또한 *B. anthracis* Pasteur No.2의 경우, 2순위까지의 동정

에도 *B. anthracis*가 포함되지 못하였다. API 50CHB와 API 20E를 동시에 사용하였을 경우에는 T 값은 거의 변화가 없었고 *B. anthracis*의 동정 확률이 43.5%까지 상승하는 효과를 보였으나, *B. anthracis* Pasteur No.2는 동정 결과에 여전히 *B. anthracis*를 포함하지 못하였다. 결과적으로 API system으로는 *B. anthracis*와 *B. cereus*는 분명하게 구별하지 못하였다.

API 50CHB만을 사용한 경우 *B. thuringiensis*를 모두 *B. cereus*로 동정하였다. 대부분 80% 이상의 높은 similarity와 0.75 이상의 높은 T값을 나타냈지만, API system에서 *B. thuringiensis* 동정은 정보가 없어 불가능하였다. *B. cereus*는 모두 1순위 동정 결과가 일치하였다. API 50CHB와 API 20E를 동시에 사용하였을 경우에는 similarity는 상승하였으나, T index는 하락하는 경향을 보이며, 결과적으로

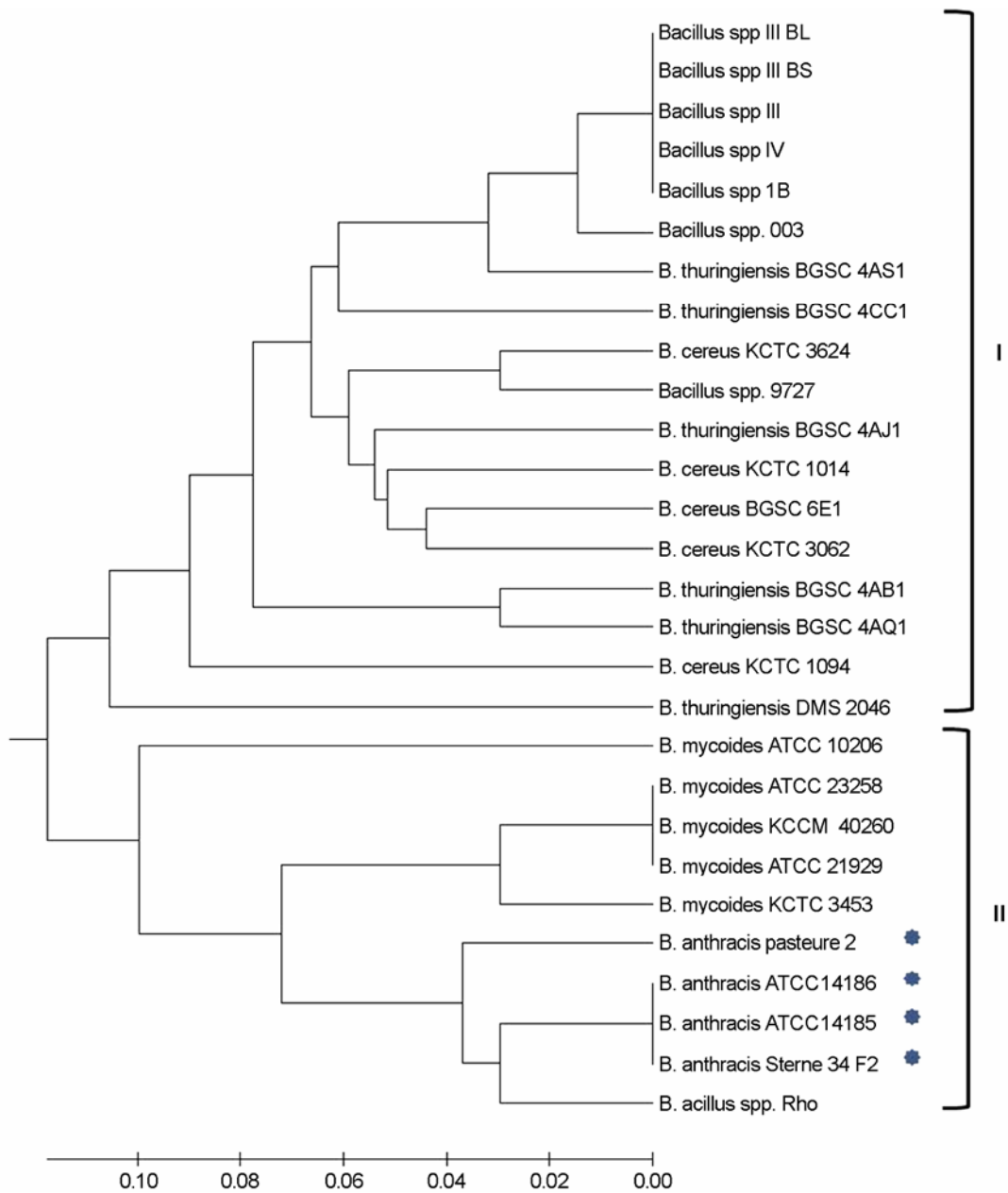


Figure 1. Dendrogram of 28 strains of *B. cereus* group constructed by UPGMA based on the bacteriological and API System (API 50CHB & API 20E). The clades are indicated by roman numerals. Clade II encompassed 4 strains of *B. anthracis*. The scale bars indicate the percentage of mismatches between biological and biochemical properties.

동정 확률이 비슷하거나 약간 하락하는 결과를 보였다.

*B. mycooides*는 API 50CHB만을 사용한 경우에 모두 1순위 동정이 일치하였다. API 50CHB와 20E를 동시에 사용하였을 경우에도 모두 1순위 동정이 일치하였다. 다만, *B. mycooides* ATCC 10206에서 similarity가 30% 상승하였으

나, *B. mycooides* KCTC 3453에서는 T값이 오히려 0.2 정도 감소하였다. 특히 *B. mycooides* ATCC 10206을 제외한 4주에 대해서는 2순위로 *B. anthracis*로 동정되었다.

B. cereus group의 표준균주 동정에 있어서 API 50CHB를 단독으로 사용하였을 때 보다 API 50CHB와 API 20E

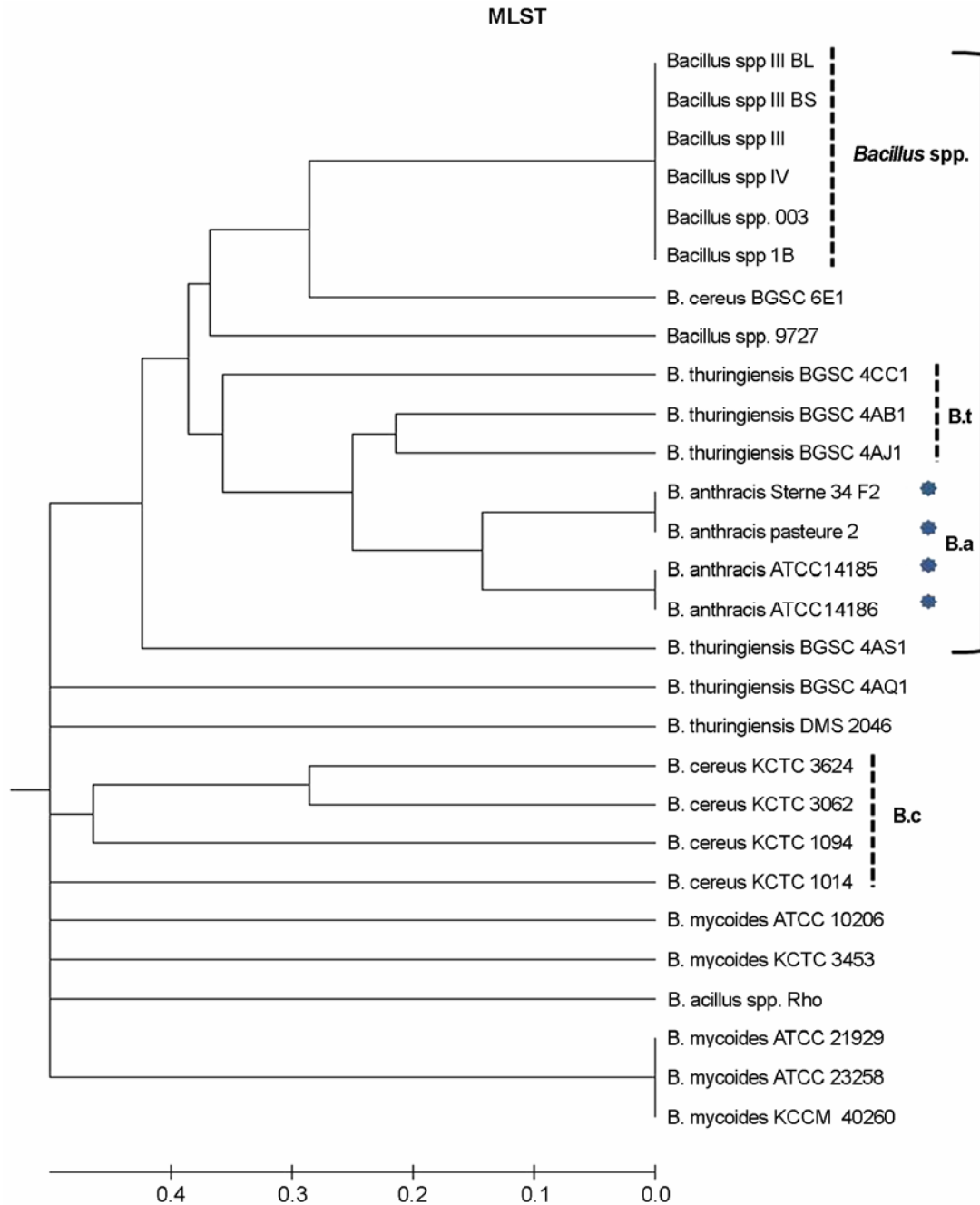


Figure 2. MLST Dendrograms were generated by UPGMA method from genetic distances. The scale bar indicate the percentages of allelic distances between STs for MLST. The MLST dendrogram shows that *B. thuringiensis* BGSC 4AJ1, 4AB1, 4CC1 were the most proximate to *B. anthracis*.

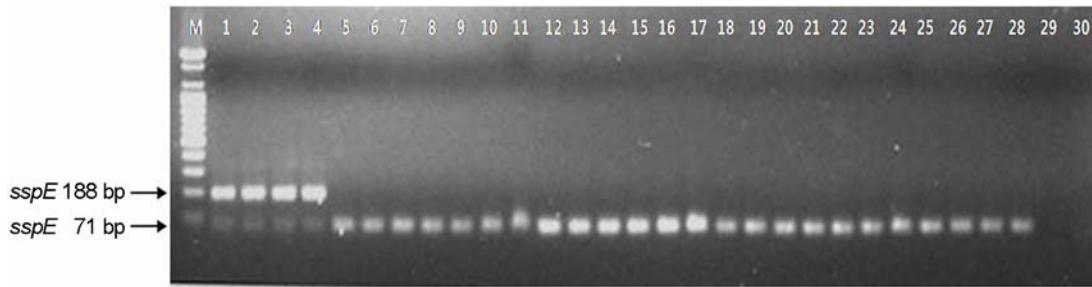


Figure 3. Agarose gel electrophoresis analysis of *sspE* gene polymerase chain reaction (PCR) on 28 strains of *B. cereus* group. Lane: M, 100-bp DNA size ladder; 1, *B. anthracis* Sterne 34-F2; 2, *B. anthracis* Pasteur No.2; 3, *B. anthracis* ATCC 14185; 4, *B. anthracis* ATCC 14186; 5, *B. thuringiensis* BGSC 4AB1; 6, *B. thuringiensis* BGSC 4AJ1; 7, *B. thuringiensis* BGSC 4AQ1; 8, *B. thuringiensis* BGSC 4AS1; 9, *B. thuringiensis* BGSC 4CC1; 10, *B. thuringiensis* DSM 2046; 11, *B. cereus* KCTC 3624; 12, *B. cereus* BGSC 6E1; 13, *B. cereus* KCTC 1014; 14, *B. cereus* KCTC 1094; 15, *B. cereus* KCTC 3062; 16, *B. mycoides* ATCC 10206; 17, *B. mycoides* ATCC 21929; 18, *B. mycoides* ATCC 23258; 19, *B. mycoides* KCCM 40260; 20, *B. mycoides* KCTC 3453; 21, *Bacillus* spp. 1B; 22, *Bacillus* spp. 003; 23, *Bacillus* spp. 9727; 24, *Bacillus* spp. IV; 25, *Bacillus* spp. III; 26, *Bacillus* spp. III BL; 27, *Bacillus* spp. III BS; 28, *Bacillus* spp. Rho; 29, *B. subtilis* ATCC 6051; 30, negative water control (no template DNA).

를 동시에 사용하였을 때 T값과 similarity %가 상승하였다. 그러나 API System은 실험에 사용된 표준균주 20주 가운데 *B. mycoides* 5주를 제외한 15주의 표준균주를 모두 *B. cereus*로 동정하였다. 그러므로 API System으로는 *B. cereus* group 세균을 명확하게 분류·동정할 수 없었다.

2) 미동정 Bacillus 동정 결과

미동정 Bacillus 8주는 0.7 이상의 T값을 나타내며 모두 *B. cereus*로 동정되었다. API 50CHB만을 사용하였을 경우와 API 20E를 동시에 사용하였을 경우를 비교해보면 미동정 Bacillus 003의 경우 1순위 동정 결과가 *B. anthracis*에서 *B. cereus*로 바뀌었고, 미동정 Bacillus Rho의 경우에는 *B. cereus*로 동정되었지만, 'Low discrimination'을 나타내며 동정이 제대로 되지 않았다.

3. 계통수 분석

1) 세균학적 검사와 API System에 의한 계통수

5가지의 세균학적 검사와 API system의 결과를 바탕으로 계통수를 작성하면 2개의 주된 그룹 (I, II)이 형성되었다 (Fig. 1). 그룹 I은 *B. cereus*, *B. thuringiensis*를 포함하며 이들이 서로 혼재하는 양상을 보였다. 그룹 II는 *B. anthracis*와 *B. mycoides*를 포함하는 그룹이며 그 안에서 각 균주들이 서로 다른 2개의 소그룹을 형성하였다. 그러나 *B. mycoides* ATCC 10206은 소그룹에 포함되지 못하였다. 미동정 Bacillus 5주는 소그룹을 형성하였고, Rho는 *B. anthracis*와 소그룹을 형성하였다.

세균학적 검사와 API System 검사는 *B. anthracis*와 *B. mycoides*의 분류가 가능하였다. 그러나 *B. cereus*와 *B.*

*thuringiensis*를 구별하지 못하였다.

2) MLST 결과에 의한 계통수 분석

총 28균주의 염기서열유형 (Sequence Type)을 이용하여 계통수를 작성하였다 (Fig. 2). *B. anthracis* 4균주는 같은 그룹을 형성하였다. *B. anthracis* Pasteur No.2와 Sterne 34-F2가 동일한 염기서열유형을 나타냈으며, *B. anthracis* ATCC 14185와 ATCC 14186이 동일한 염기서열유형을 보였다. *B. anthracis*는 *B. thuringiensis*와 가장 유사함을 보였으며, 미동정 Bacillus Rho와는 차이를 보였다. 미동정 Bacillus 6주 (III BL, III BS, III, IV, 003, 1B)가 동일한 염기서열유형을 보이며 소그룹을 형성하였다. *B. thuringiensis*는 2개의 소그룹을 형성하였고, *B. cereus* 균주들은 서로 근접하여 그룹을 형성하였다.

MLST는 *B. cereus* group 중 *B. anthracis*와 미동정 Bacillus를 비교적 명확하게 분류할 수 있었다. *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides* 균주들은 각각 소그룹을 형성하였으나 일부 균주들은 그룹을 형성하지 못하였다.

4. 세균학적 검사와 *sspE* 중합효소연쇄반응 결과의 병행

1) *sspE* 중합효소연쇄반응 결과

B. anthracis 4주에 대한 *sspE* 중합효소연쇄반응 결과에서 188 bp, 71 bp의 증폭 산물을 확인할 수 있었다. 표준균주 중 *B. anthracis* 4주를 제외한 *B. cereus* 5주, *B. mycoides* 5주, *B. thuringiensis* 6주 모두에서는 71 bp만이 증폭되었다 (Fig. 3). 또한 미동정 Bacillus 8균주도 71 bp 증폭 산물이 나타났는데, 이를 근거로 Rho를 비롯한 미동정 Bacillus 균주는 *B. anthracis*가 아니라는 것을 확인

하였다. 대조군으로 사용한 *B. subtilis*는 음성 결과를 나타냈다.

2) 세균학적 검사와 *sspE* 중합효소연쇄반응 결과 병행에 의한 계통수

세균학적 검사, *sspE* 유전자 중합효소연쇄반응 결과를 동시에 적용하여 계통수를 작성한 결과, 3개의 주그룹 (I,

II, III)을 형성하였다 (Fig. 4). 그룹 I에는 미동정 *Bacillus*, *B. thuringiensis*, *B. cereus*가 포함되었으며, 각 균주는 종별로 소그룹을 형성하였다. 특히 Rho를 제외한 미동정 *Bacillus* 7주는 *B. cereus*와 같은 소그룹을 형성하였다. 그룹 II는 *B. mycooides* 5주가 소그룹을 형성하였고, 미동정 *Bacillus* Rho와 *B. cereus* 1094가 소그룹을 형성하였다. 그

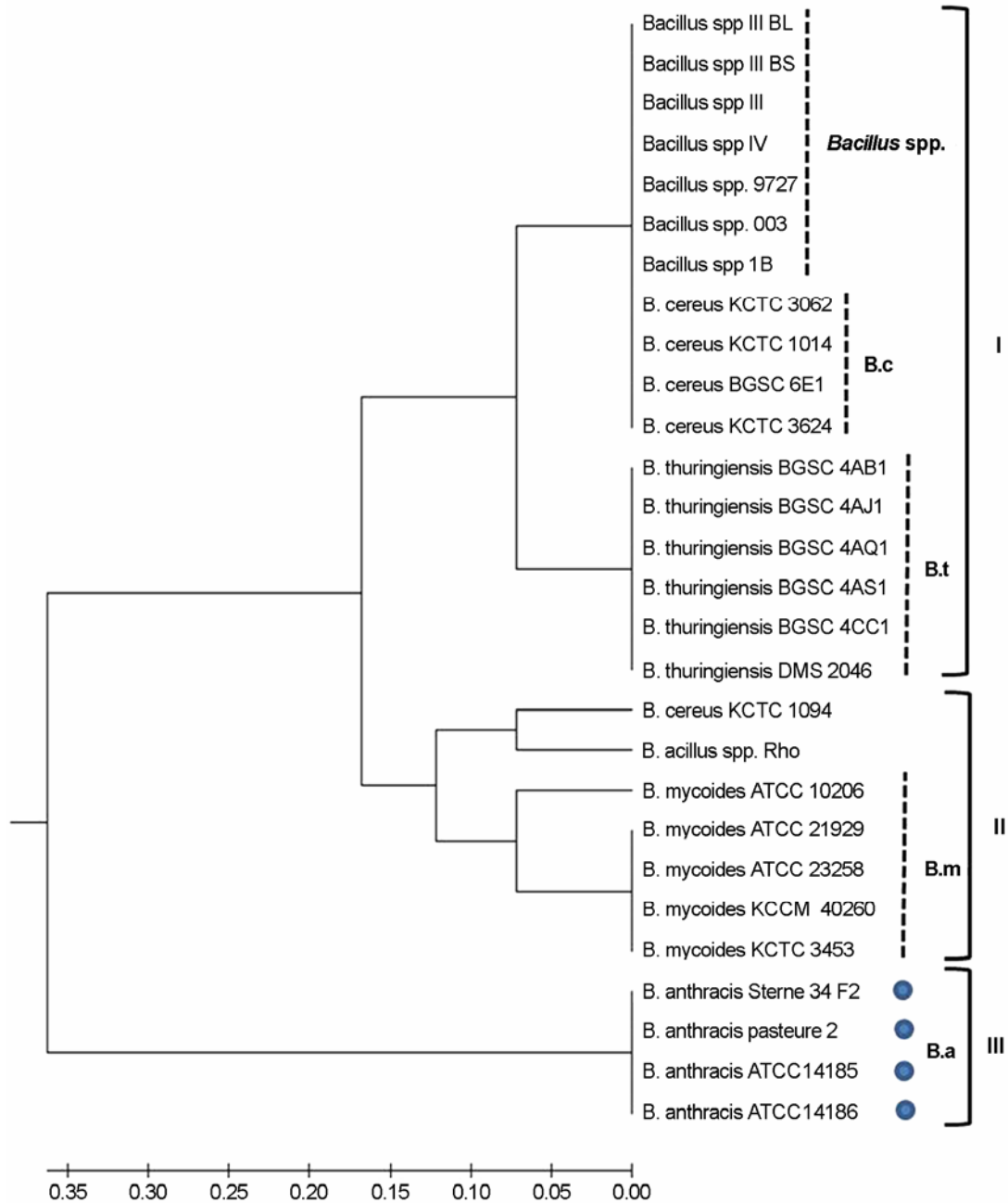


Figure 4. Dendrogram of 28 strains of *B. cereus* group constructed by UPGMA based on the bacteriological and *sspE* gene PCR. The clades are indicated by roman numerals. Clade III encompassed 4 strains of *B. anthracis*. The scale bars indicate the percentage of mismatches between biological and *sspE* gene PCR results.

룹 III는 *B. anthracis* 4주가 그룹을 형성하여 *B. cereus* group내 다른 균종과 분명하게 구별이 되었다. 결과적으로 세균학적 검사와 *sspE* 중합효소연쇄반응 결과를 병행한 방법은 *B. cereus* group 세균들을 종별로 각각 분류시켰으며, 특히 미동정 *Bacillus* 균주들이 *B. cereus*에 속함을 알 수 있었다.

고 찰

B. cereus group 세균들을 분류·동정하는 방법으로 먼 양혈구배지에서의 용혈성, 운동성, penicillin 감수성, 나무뿌리 모양의 집락형태, 결정체 독소형성 등을 확인하는 세균학적 실험법이 이용되었다 (8,23,26,28). 본 연구에서 *B. cereus* group 표준균주들에 대한 세균학적 검사 결과, 표준균주로서의 예측과 대부분 일치하였다. 그러나, 일부 검사에서 기대 결과와 다른 양상을 나타내었다. 또, 미동정 *Bacillus* 균주는 Rho를 제외한 7주는 표준균주 *B. cereus*와 세균학적 성상이 같았다.

세균학적 검사 외에 생화학적 검사가 개발되어 이용되고 있지만, *B. cereus* group 세균들의 유사한 생화학적 특성으로 인해 정확하게 동정하지 못하는 실정이다 (5,18,19,20). 본 연구에서도 API system을 이용한 *B. cereus* group의 동정 결과는 *B. anthracis*와 *B. cereus*를 분명하게 구별하지 못하였다. 특히 *B. anthracis*를 *B. cereus*로 동정하였다. API system의 가장 큰 단점은 결과를 주관적으로 판단한다는 것이고, 이러한 방법은 실험자에 따른 오차 가능성이 크다. 그러므로 실험의 오차를 최소화하기 위하여 Borderline의 기준을 명확하게 결정하는 것이 필요하다고 판단되었다. 이 연구에서는 일부 생화학적 검사에서 불명확한 결과를 나타낸 3균주 (*B. thuringiensis* BGSC 4CC1, 미동정 *Bacillus* 9727, *B. mycoides* KCCM 40260)를 API 50CHB 배지에 배양하고 색 변화를 6시간 간격으로 관찰하였을 때 48시간까지도 배지의 미세한 색 변화는 계속되었다. 또한 24시간까지의 색 변화는 현저하게 증가하나 24시간부터 48시간까지의 색 변화가 천천히 진행됨을 확인할 수 있었으며, 이것은 세균의 증식과 관계있을 것으로 생각된다. 그러므로 균주 접종 시기부터 24시간까지의 색 변화가 현저하게 일어난다면 24시간 이후의 색 변화가 거의 없어도 그 검사는 양성으로 판독하는 것이 옳다고 생각된다.

본 연구에서 현재 *B. cereus* group의 동정에 이용되고

있는 생화학적 검사와 세균학적 검사 결과를 함께 이용하였다. 각각의 검사만으로는 만족할 만한 동정 결과를 얻지 못하였기 때문에, 세균학적, 생화학적 검사 결과를 조합하여 계통수를 작성하였다. 계통수 작성은 다른 동정 과정과 비교하기 위해서이다. 즉, 계통수에서 각 균종들이 동일 그룹을 형성하면 그 조합된 동정 과정이나 검사가 *B. cereus* group의 동정에 유용한 것이라고 판단하였다. 세균학적 검사와 생화학적 검사 결과로 계통수를 작성한 결과, *B. cereus*, *B. thuringiensis*가 섞여서 존재하였다. 또 *B. anthracis*와 미동정 *Bacillus* Rho가 소그룹을 형성하였으며, *B. mycoides*는 같은 균종끼리 소그룹을 형성하였다. 따라서 세균학적 검사와 생화학적 검사 결과를 종합하여도 *B. cereus* group의 분류가 불완전함을 알 수 있었다. 다만, 지금 사용되고 있는 동정 방법인 생화학적 검사로 잠정적 동정을 한 후에 세균학적 검사 결과를 추가한다면 *B. cereus*와 *B. thuringiensis*를 구별할 수 있다. 이 연구에서 시도한 동시 조합은 잘못된 동정을 초래할 수 있다고 판단되었다.

저자들이 이전 연구에서 보고한 *B. cereus* group의 MLST 결과를 인용했을 때 (15), *B. anthracis*와 미동정 *Bacillus*를 명확하게 분류할 수 있었으며, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides* 균주들은 각각 소그룹을 형성하였다. 그러나, 일부 균주들은 그룹을 형성하지 못하였다. 세균학적 검사와 API System 조합에서는 미동정 *Bacillus* 소그룹이 *B. cereus* BGSC 6E1과 가장 가깝게 위치하여 MLST 결과와 일치하였다. 또한 MLST 결과에서 부분별로 소그룹을 형성하였던 *B. thuringiensis*는 세균학적 검사와 API system 조합에서는 서로 매우 가깝게 위치하였다. *B. anthracis*의 경우에는 세균학적 검사와 API System의 검사의 병행은 MLST 결과와 상당부분 일치하였다. 세균학적 검사와 API System의 결과에서 동일한 표현형을 보이는 미동정 *Bacillus* 5주 (IIIBL, IIIBS, III, IV, IB)는 MLST에서도 동일한 염기서열유형을 보이며 두 검사에서 일치하는 결과를 보였으나, 미동정 *Bacillus* 003은 두 검사법에서 약간의 차이를 나타내었다. 특히 세균학적, 생화학적 그룹과는 달리 *B. anthracis*와 *B. thuringiensis*가 가장 가깝게 그룹을 형성하여 분자형과 표현형의 유연관계는 그룹 간에 차이가 있음을 확인할 수 있었다. 따라서 MLST를 사용한 *B. cereus* group의 분류는 불완전하다는 것을 알 수 있었다. 이는 최근에 *B. cereus* group의 분류·동정을 위하여 MLST 외에도 염색체 유전자 중합효소연쇄반응

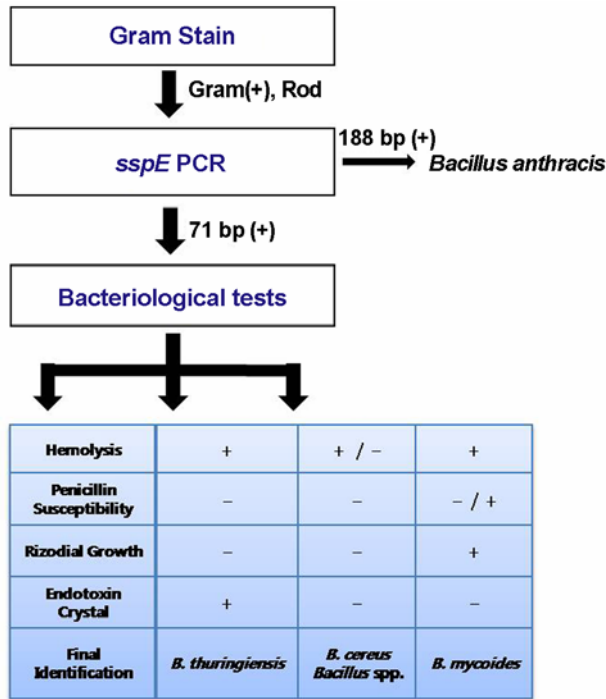


Figure 5. The Identification scheme of *Bacillus cereus* group. (First step) Gram stain, (Second step) Differentiation of *Bacillus cereus* group by *sspE* gene PCR, (Third step) Additional bacteriological tests and final identification

결과를 추가하여 신뢰할 만한 결과를 얻었다고 보고한 것과 부합하였다 (21). 본 실험에서도 저자들이 이전에 보고하였던 아포 관련 유전자 *sspE* 중합효소연쇄반응을 이용하였다. 즉, *sspE* 중합효소연쇄반응으로 *B. cereus* group 중 *B. anthracis*와 그 외 다른 *B. cereus* group을 구별할 수 있었기에, 이를 다른 검사 결과와 조합하여 신속하고 간편한 *B. cereus* group의 분류·동정법을 고안하려고 하였다.

이 연구 결과에서도 확인하였듯이 생화학적 검사만으로는 표준균주에 대해서도 불명확한 결과를 나타내었다. 다만, 생화학적 검사 결과를 근거로 세균학적 검사 결과를 추가한다면 신뢰할 만한 동정 결과를 얻을 수 있다. 이 연구에서는 신속, 간편함을 목적으로 하여 세균학적 검사와 *sspE* 중합효소연쇄반응 결과를 조합하였다. 세균학적 검사와 *sspE* 중합효소연쇄반응 결과를 조합한 계통수에서 각 균종들은 각각 동일한 소그룹을 형성하였다. 즉, 표준균주 각 균종끼리 한 그룹을 형성하여 *B. cereus* group 동정에 세균학적 검사와 *sspE* 중합효소연쇄반응 검사를 동시에 사용하면 신뢰성이 있음을 확인하였다.

그리고, Rho를 제외한 미동정 *Bacillus* 7주는 *B. cereus*와 같은 그룹을 형성하여, 미동정 *Bacillus*가 *B. cereus*임을 시사하였다. Rho는 분리 당시에 실험동물에 병원성이 없기에 *B. anthracis*가 아닌 것으로 밝혀졌지만, 병원성을 제외한 성상이 *B. anthracis*와 동일하여 유사탄저균으로도 불리웠다 (1). Rho가 *B. anthracis*와 다른 그룹을 형성한 것으로부터 이 연구에서 제안한 세균학적 검사와 *sspE* 중합효소연쇄반응 결과를 조합한 방법의 유용성을 확인할 수 있었다. 다만, Rho와 *B. cereus* KCTC1094가 소그룹을 형성하며 *B. cereus* 소그룹과 떨어져 있는 것이 해결해야 할 과제이다.

이상의 결과들로 이 연구에서 제안한 세균학적 방법과 *sspE* 중합효소연쇄반응 결과의 조합이 간편하면서도 신뢰할 수 있는 방법임을 확인하였다. 이를 근거로 하여 *B. cereus* group을 분류·동정하는 새로운 방법을 제시하였다 (Fig. 5). 실제로 저자들은 환경분리주 중 세균학적, 생화학적 검사로 *B. cereus*로 동정된 44주에 대해 새로운 동정 과정을 수행하였을 때 모두 일치하는 성적을 나타냈다 (미발표). 현재 미생물 분류 동정에 있어 다상분류법의 유용성이 인정받고 있는데, *B. cereus* group 세균을 분류 동정하기 위해 여러 가지 방법을 사용하는 것보다 이 연구에서 제안한 *sspE* 중합효소연쇄반응과 세균학적 방법을 조합한 동정 과정이 신속하고, 간단하면서도 만족할 만한 수준의 신뢰성을 제공한다고 생각된다.

다만, 이 연구에서 비록 표준균주를 사용하였지만, 균주수가 너무 작으며, 수많은 종류의 *Bacillus*를 동정하는 방법으로 이용되기 위해서는 앞으로 더 많은 표준균주들과 환경분리주, 임상검체들을 통하여 확인 보완이 필요하다고 생각한다.

참 고 문 헌

- 1) 최철순, 김민희, 정상인, 양용태: 탄저균 병원성 및 약독백신주의 유사 *Bacillus* species로부터 간이감별을 위한 주요 배양 및 생물학적 성상. 대한미생물학회지 **27**: 93-102, 1992.
- 2) Anderson GL, Simchock JM, Wilson KH: Identification of a region of genetic variability among *Bacillus anthracis* strains and related species. *J Bacteriol* **178**: 377-384, 1996.
- 3) Ash C, Collins MD: Comparative analysis of 23S ribosomal RNA gene sequences of *Bacillus anthracis* and emetic *Bacillus*

- cereus* determined by PCR-direct sequencing. *FEMS Microbiol Lett* **73**: 75-80, 1992.
- 4) **Ash C, Farrow JA, Dorsch M, Stackebrandt E, Collins MD**: Comparative analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and related species on the basis of reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *Int J Syst Bacteriol* **41**: 343-346, 1991.
 - 5) **Logan NA, Carman JA, Melling J, Berkeley RC**: Identification of *Bacillus anthracis* by API tests. *J Med Microbiol* **20**: 75-85, 1985.
 - 6) **Bourque SN, Valero JR, Lavoie MC, Levesque RC**: Comparative Analysis of the 16S to 23S Ribosomal Intergenic Spacer Sequence of *Bacillus thuringiensis* strains and Subspecies and of Closely Related Species. *Appl Environ Microbiol* **61**: 1623-1626, 1995.
 - 7) **Feil EJ**: How Stable Are the Core Genes of Bacterial Pathogen? *ASM News* **69**: 234-239, 2003.
 - 8) **Gebhardt C, Murray P, Wood WA, Krig NR**: Method for general and molecular bacteriology, American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1994.
 - 9) **Green BD, Battisti L, Koehler TM, Thorne CB, Ivins BE**: Demonstration of capsule plasmid in *Bacillus anthracis*. *Infect Immun* **49**: 291-297, 1985.
 - 10) **Harbottle H, White DG, McDermott PF, Walker RD, Zhao S**: Comparison of multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis, and antimicrobial susceptibility typing for characterization of *Salmonella enterica* serotype newport isolates. *J Clin Microbiol* **44**: 2449-2457, 2006.
 - 11) **Helgason E, Tourasse NJ, Meisal R, Caugant DA, Kolsto AB**: Multilocus Sequence Typing Scheme for Bacteria of the *Bacillus cereus* Group. *Appl Environ Microbiol* **70**: 191-201, 2004.
 - 12) **Jolley KA, Feil EJ, Chan MS, Maiden MC**: Sequence type analysis and recombinational tests (START). *Bioinformatics* **17**: 1230-1231, 2001.
 - 13) **Kaneko T, Nozaki R, Aizawa K**: Deoxyribonucleic acid relatedness between *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol Immunol* **22**: 639-641, 1978.
 - 14) **Kim K, Cheon E, Wheeler KE, Youn Y, Leighton TJ, Park C, Kim W, Chung S**: Dermination of the Most Closely Related *Bacillus* Isolates to *Bacillus anthracis* by Multilocus Sequence Typing. *Yale J Biol Med* **78**: 1-14, 2005.
 - 15) **Kim KJ, Seo JW, Wheeler K, Park CM, Kim DW, Park SJ, Kim WY, Chung SI, Leighton T**: Rapid genotypic detection of *Bacillus anthracis* and the *Bacillus cereus* group by multiplex real-time PCR melting curve analysis. *FEMS Immunol Microbiol* **43**:301-310, 2005.
 - 16) **Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, Nei M**: MEGA2: Molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics* **17**: 1244-1245, 2001.
 - 17) **Lechner S, Mayr R, Francis KP, Pruss BM, Kaplan T, Wiessner-Gunkel E, Stewart GS, Scherer S**: *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. *Int J Syst Bacteriol* **48 Pt 4**: 1373-1382, 1998.
 - 18) **Logan NA, Berkeley RCW**: Classification and identification of members of the genus *Bacillus* using API tests. pp 105-140. *In The Aerobic Endospore-forming Bacteria: Classification and Identification*, Berkeley RCW and Goodfellow M (Ed), Academic Press, London, 1981.
 - 19) **Logan NA, Berkeley RC**: Identification of *Bacillus* Strains Using the API System. *J Gen Microbiol* **130**: 1871-1882, 1984.
 - 20) **Logan NA, Capel BJ, Melling J, Berkeley RC**: Distinction between emetic and other strains of *Bacillus cereus* using the API SYSTEM and Numerical methods. *FEMS Microbiology Letters* **5**: 373-375, 1979.
 - 21) **Marston CK, Gee JE, Popovic T, Hoffmaster AR**: Molecular approaches to identify and differentiate *Bacillus anthracis* from phenotypically similar *Bacillus* species isolates. *BMC Microbiol* **6**: 22, 2006.
 - 22) **Morgan U, Ochman H, Renaud F, Tibayrenc M**: Population genetics and Population biology: What did they bring to the epidemiology of transmissible disease? *Infect Genet Evol* **1**: 161-166, 2001.
 - 23) **Murray PR, Baron EJ**: Manual of Clinical Microbiology, Sixth edition, pp 349-356. ASM Press, 1995.
 - 24) **Nakamura LK**: *Bacillus pseudomycoloides* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **48 Pt 3**: 1031-1035, 1998.
 - 25) **Patra G, Sylvestre P, Ramisse V, Thérasse J, Guesdon JL**: Isolation of a specific chromosomal DNA sequence of *Bacillus anthracis* and its possible use in diagnosis. *FEMS Immunol Med Microbiol* **15**: 223-231, 1996.
 - 26) **Rhodehamel EJ, Harmon SM**: Chapter 14 *Bacillus cereus*. *In Bacteriological Analytical Manual online*, 8th Edition, US Department of Health and Human Services and US Food and Drug Administration, 2001.
 - 27) **Seki T, Chung C, Mikami H, Oshima Y**: Deoxyribonucleic

- acid homology and taxonomy of the genus *Bacillus*. *Int J Syst Bacteriol* **28**: 182-189, 1978.
- 28) **Sneath PH, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG**: Bergey's manual of Systematic bacteriology. Vol. 2 pp 1105-1138. Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 1986.
- 29) **Turnbull PC, Hutson RA, Ward MJ, Jones MN, Quinn CP, Finnie NJ, Duggleby CJ, Kramer JM, Melling J**: *Bacillus anthracis* but not always anthrax. *J Appl Bacteriol* **72**: 21-28, 1992.
- 30) **Yamada S, Ohashi E, Agata N, Venkateswaran K**: Cloning and nucleotide sequence analysis of *gyrB* of *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycooides*, and *B. anthracis* and their application to the detection of *B. cereus* in rice. *Appl Environ Microbiol* **65**: 1483-1490, 1999.
-