



## Study of bioinformatics and phylogenetic relationship of Iranian *Bacillus thuringiensis* strains by using 16S rDNA gene sequence

Maryam Rashki<sup>1</sup>, Mojtaba Mortazavi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Biodiversity, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran. <sup>2</sup>Department of Biotechnology, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran.

### Abstract

**Background & Objectives:** Gram-positive bacterium, *Bacillus thuringiensis*, produces protein crystals with insecticidal properties. Partial rDNA sequence analysis is used to study the evolution and classification of living organisms. The study was conducted on 16S rDNA sequence of five native isolates of *Bacillus thuringiensis* using the polymerase chain reaction technique.

**Materials & Methods:** Characteristics and phylogenetic relationships between five sequences of native isolates along with other isolates in the gene bank and other species of the genus *Bacillus* were performed with Mesquite software and leBIBIQBPP database.

**Results:** The five native isolates were 92.06 to 99.93% similar to each other and 99.73% to 100% similar to other isolates of *Bacillus thuringiensis*. Phylogenetic trees showed Bt 1019, Bt 1020 and Bt 1039 in the first group and Bt 1001 and Bt 1091 in the second group. Based on Bt 1001 sequence analysis using leBIBIQBPP, the minimum distance with *Bacillus frigoritolerans* was obtained. The sequence of *Bacillus anthracis* was close to Bt 1019. The Bt 1020 sequence was closest to *Bacillus cereus*. In the case of Bt 1039, in addition to *Bacillus cereus*, the lowest distance was observed with *Bacillus marcorinectum*. The Bt 1091 sequence showed the most similarity with *Bacillus frigoritolerans*.

**Conclusion:** Protein crystals were observed in the native bacteria. Toxic crystals are produced only by *Bacillus thuringiensis*. BLAST program for 16S rDNA gene sequence in the native isolates also showed the most similarity to *Bacillus thuringiensis* isolates in the gene bank. Moreover, the results predicted that the three native isolates *Bt 1019*, *Bt 1020* and *Bt 1039* could be toxic against lepidopteran pests and two isolates *Bt 1001* and *Bt 1091* could be toxic against coleopteran pests.

**Keywords:** 16S rDNA, BLAST, bioinformatics, software, polymerase chain reaction.

Received: 22 December 2021

Revised: 16 March 2022

Accepted: 10 May 2022

Correspondence to: Maryam Rashki

Tel: +98 3433776611

E-mail: [ma\\_rashkigh@yahoo.com](mailto:ma_rashkigh@yahoo.com)

Journal of Microbial World 2022, 15(1): 41-55

DOI:10.30495/jmw.2022.1959243.2021



Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.



## مطالعه بیوانفورماتیک و روابط فیلوژنتیک جدایه‌های ایرانی باکتری باسیلوس تورینجینسیس با استفاده از توالی ژن *SrDNA16*

مریم راشکی<sup>۱\*</sup> و مجتبی مرتضوی<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> گروه تنوع زیستی، پژوهشکده علوم محیطی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران.  
<sup>۲</sup> گروه بیوتکنولوژی، پژوهشکده علوم محیطی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران.

### چکیده

**سابقه و هدف:** باکتری گرم مثبت باسیلوس تورینجینسیس بلورهای پروتین با خاصیت حشره‌کشی تولید می‌کند. تحلیل توالی‌های کوچک ژن rDNA برای مطالعه تکامل و رده‌بندی موجودات زنده به کار می‌رود. این مطالعه با استفاده از تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمرز روی توالی S Rdna ۱۶ از پنج جدایه بومی باسیلوس تورینجینسیس انجام شد.  
**مواد و روش‌ها:** بررسی ویژگی‌ها و روابط فیلوژنتیک میان پنج توالی جدایه‌های بومی همراه با جدایه‌های دیگر موجود در بانک ژن و سایر گونه‌های جنس باسیلوس، با نرم‌افزار مسکوئیت و پایگاه leBIBI<sup>QBPP</sup> انجام شد.  
**یافته‌ها:** پنج جدایه بومی به میزان ۹۲/۰۶ تا ۹۹/۹۳ درصد با یکدیگر و به میزان ۹۹/۷۳ تا ۱۰۰ درصد با سایر جدایه‌های باسیلوس تورینجینسیس شباهت داشتند. درخت فیلوژنتیک نشان داد Bt 1019، Bt 1020 و Bt 1039 در گروه اول و Bt 1001 و Bt 1091 در گروه دوم قرار گرفتند. بر اساس تحلیل توالی Bt 1001 با کمک leBIBI<sup>QBPP</sup>، کمترین فاصله با باسیلوس فریگوریتولرانس بدست آمد، همچنین توالی Bt 1091 نیز بیشترین شباهت را با باکتری مذکور نشان داد. توالی باسیلوس آنتراسیس به Bt 1019 نزدیک بود. توالی Bt 1020 بیشترین نزدیکی را با باسیلوس سرئوس داشت. در مورد Bt 1039 علاوه بر باسیلوس سرئوس، کمترین فاصله با باسیلوس مارکورستینکتوم مشاهده شد.

**نتیجه‌گیری:** بلورهای پروتینی در باکتری‌های بومی مشاهده شدند. بلاست توالی ژن *SrDNA 16* در جدایه‌های بومی بیشترین شباهت را به جدایه‌های باسیلوس تورینجینسیس موجود در بانک ژن نشان داد. همچنین به دلیل استخراج بلورهای سم از جدایه‌ها، نتایج پیش‌بینی کرد سه جدایه بومی Bt 1019، Bt 1020 و Bt 1039 علیه آفات بالپولکداران و دو جدایه Bt 1001 و Bt 1091 علیه آفات سخت بالپوش می‌توانند موثر و سمی باشند.

**واژگان کلیدی:** *SrDNA 16*، بلاست، بیوانفورماتیک، نرم‌افزار، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز.

پذیرش مقاله: ۱۴۰۱/۲/۲۰

ویرایش مقاله: ۱۴۰۰/۱۲/۲۵

دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۱۰/۱

### مقدمه

شده است (۱). عموماً، عوامل میکروبی علیه آفات هدف بسیار تخصصی عمل می‌کنند و باعث حفظ حشرات مفید در محصولات تیمار شده می‌شوند (۲). باسیلوس تورینجینسیس (*Bacillus thuringiensis*) باکتری گرم مثبتی است که بلورهای پروتین با خاصیت حشره‌کشی تولید می‌کند (۳). این باکتری،

استفاده از حشره‌کش‌های شیمیایی باعث ظهور و گسترش مقاومت در ناقلین بیماری‌های انسانی و تخریب محیط‌زیست

(\* آدرس برای مکاتبه: گروه تنوع زیستی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران.  
تلفن: ۰۳۴۳۳۷۷۶۱۱  
پست الکترونیک: ma\_rashkigh@yahoo.com



و ابزارهای بیوانفورماتیک بود. بدین ترتیب، توالی ژن‌های *16S rDNA* متعلق به پنج جدایه بومی باسیلوس تورینجینسیس با یکدیگر و با تعدادی از توالی‌های ثبت‌شده در بانک ژن مقایسه و روابط فیلوژنتیک (phylogenetic relationship) این جدایه‌ها تعیین شدند.

### مواد و روش‌ها

**الف) نمونه‌برداری:** نمونه‌های خاک از عمق پنج تا ۱۰ سانتی‌متری از استان‌های کرمان (کرمان)، مرکزی (خمین)، اصفهان (گلپایگان)، فارس (شیراز) و خراسان رضوی (چناران) جمع‌آوری شدند. به این صورت که، از هر نمونه میزان ۵۰ گرم خاک در ظرف‌های پلاستیکی استریل ریخته و کدگذاری شد. نمونه‌های مذکور در آزمایشگاه و در دمای چهار درجه سلسیوس نگهداری شدند.

**ج) جداسازی جدایه‌های بومی باکتری باسیلوس تورینجینسیس:** از روش انتخابی استات سدیم برای جداسازی استفاده شد (۱۰). به این صورت که، یک گرم از هر نمونه خاک (پس از الک شدن) در ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع لوری برتانی (Luria-Bertani, ibresco®) (تریپتون، مخمر، کلرید سدیم) حاوی استات سدیم ۰/۲۵ مولار (۲۰ گرم در لیتر) به مدت چهار ساعت در ۳۰ درجه سلسیوس با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه کشت شد. سپس یک میلی‌لیتر از هر نمونه کشت شده به مدت ۱۰ دقیقه تحت شوک حرارتی ۷۰ تا ۸۰ درجه سلسیوس قرار گرفت. پس از سرد شدن محلول حاوی اسپورهای باکتری، ۵۰ میکرولیتر از هر نمونه روی محیط جامد نوترینت آگار (Nutrient Agar, BioMaxima S.A.®) (۲۸ گرم در لیتر) کشت و در دمای ۳۵ درجه سلسیوس نگهداری شد.

**د) بررسی جدایه‌های بومی باکتری باسیلوس تورینجینسیس:** اولین و مهمترین گام در بررسی باکتری باسیلوس تورینجینسیس، رنگ‌آمیزی گرم (gram staining) و در ادامه و آبی کوماسی (Coomassie Blue) و مشاهده بلور پروتینی به وسیله میکروسکوپ فاز کنتراست و گروه‌بندی آن از لحاظ شکل بلور پروتینی بود. مراحل رنگ‌آمیزی با کیت رنگ‌آمیزی

بیش از نیم‌قرن به‌عنوان حشره‌کش زیستی استفاده شده است و ابزاری ایمن، خاص و موثر برای کنترل طیف گسترده‌ای از حشرات آفت است (۴). جدایه‌های باکتری باسیلوس تورینجینسیس علیه حشرات آفت متعلق به راسته‌های بالپولکداران، دوبالان و سخت‌بال‌پوشان، فعالیت دارند (۳). در برخی موارد، مقاومت حشرات آفت نسبت به سموم کریستال باکتری باسیلوس تورینجینسیس مشاهده شده است (۵). بنابراین، به‌طور مداوم مطالعات فراوانی در خصوص جداسازی و شناسایی جدایه‌های جدید و بومی انجام می‌شود.

تجزیه و تحلیل توالی‌های کوچک ژن *rDNA* برای مطالعه تکامل و رده‌بندی موجودات زنده به‌کار می‌رود و با استفاده از تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (Polymerase Chain Reaction)، بر روی توالی *16S rDNA* در باکتری‌ها تحقیقات فراوانی انجام شده است (۶). مقایسه این توالی‌ها نشان می‌دهد که توالی‌های ژن *rDNA* در میان موجودات زنده از یک جنس و گونه بسیار ثابت و حفظ‌شده است اما بین موجودات متعلق به جنس و گونه‌های گوناگون، متفاوت می‌باشد (۶). محققین نشان دادند که ناحیه انتهایی ۵' همان ناحیه بیش از حد متغیر (hypervariable region) در این ژن و در هر جدایه بسیار اختصاصی است و شاخصی قابل استفاده برای شناسایی و گروه‌بندی گونه‌های جنس باسیلوس محسوب می‌شود (۷). به‌طور مثال، مطالعه تعدادی از جدایه‌های جنس باسیلوس نشان دهنده تنوع ژن‌های *16S rDNA* در دو گونه باسیلوس سرئوس (*Bacillus cereus*) و باسیلوس تورینجینسیس بود (۸).

با این وجود، برای مطالعه باکتری‌ها، استفاده از برنامه‌های مختلف در کنار تکنیک‌های توالی‌یابی الزامی است و کاربرد بلاست (BLAST) بدون داده‌های فیلوژنتیک (phylogenetic) برای شناسایی باکتری‌ها مناسب نیست (۹). بدین منظور، ابزار بیوانفورماتیک خاص برای مطالعه و بررسی باکتری‌ها (BIBI) ارائه شده است که قادر به آسان‌کردن تجزیه و تحلیل توالی‌ها است (۹).

هدف از این تحقیق، بررسی فیلوژنتیک جدایه‌های بومی این باکتری با استفاده از تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، توالی‌یابی

تورینجینسیس: برای بررسی روابط فیلوژنتیکی جدایه‌های بررسی شده در این پژوهش با یکدیگر و با سایر جدایه‌های هم‌گروه ثبت شده در بانک ژن، ۴۴ جدایه از بانک ژن استخراج شد. گونه باسیلوس سوتیلیس زیرگونه ناتو (*Bacillus subtilis* subspecies *natto*) به‌عنوان گونه خارج گروه (out-group) در نظر گرفته شد.

با ابزار بلاست (BLAST) در پایگاه مرکز ملی اطلاعات زیست‌فناوری (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)، توالی نوکلئوتیدی جدایه‌های بومی برای شناسایی باکتری‌ها براساس شباهت توالی، بررسی شدند. توالی‌های انتخاب شده از پایگاه مرکز ملی اطلاعات زیست‌فناوری و جدایه‌های بومی با استفاده از نرم‌افزار مفتی (MAFFT v.7) (۱۲) هم‌تراز و سپس، با استفاده از نرم‌افزار مسکوئیت (Mesquite v. 3.10) (۱۳) بررسی شدند. با استفاده از نرم‌افزار آی‌کیو-تری (IQ-tree) (Nguyen *et al.* 2015) (۱۴) و اسپیلیت‌تری (SplitsTree v. 4.16.1) (۱۵) به ترتیب درختی با بیش‌ترین احتمال ساخته شد تا روابط فیلوژنتیک میان توالی‌های هم‌تراز شده تعیین شوند و شبکه فیلوژنتیکی نیز رسم شد. درخت ایجاد شده با استفاده از نرم‌افزار فیگ‌تری (Figtree v. 1.4.3) (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) قابل مشاهده شد.

ز) بررسی نواحی حفظ شده (*motifs*): برای مشاهده نواحی حفظ شده در توالی نوکلئوتیدی ژن ۱۶S rDNA در جدایه‌های بومی باکتری باسیلوس تورینجینسیس مورد بررسی، از پایگاه موتیف‌سرچ (MOTIF Search) استفاده شد و سپس، توالی‌های حفظ شده با جزییات بیشتر با برنامه وب‌لوگو (Weblogo v. 2.8.2) (۱۶) بررسی شدند.

ح) بررسی روابط فیلوژنتیک: به کمک پایگاه‌های اطلاعاتی و نرم‌افزارهای زیست‌شناسی، توالی کامل ناحیه کلون شده پنج جدایه بومی باسیلوس تورینجینسیس با سایر گونه‌های باکتری مقایسه و مطالعه شدند. بدین‌منظور، به کمک پایگاه اطلاعاتی-محاسبه‌ای leBIBI<sup>OBPP</sup> (<http://umr5558-leBIBI>) این پنج توالی

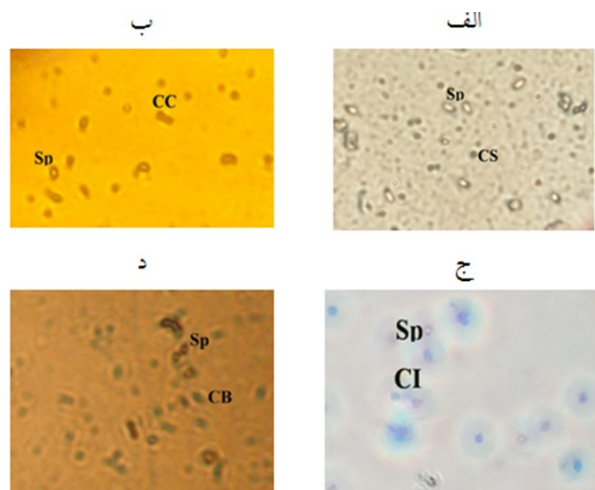
گرم بهارافشان<sup>®</sup> به این شرح است: ابتدا رنگ کریستال ویوله (*crystal violet*) به مدت ۶۰ ثانیه روی گستره باکتری ریخته شد. پس از شستشو با آب، به مدت ۶۰ ثانیه با لوگل (*Lugol's iodine*) پوشانده شد. پس از شستشوی گستره با آب، در معرض یک تا دو قطره الکل استون (به عنوان ماده رنگ‌زدا) قرار گرفت. سپس، با آب شستشو شد. در انتها سطح گستره با سافرانین (*safranin*) به مدت ۶۰ ثانیه پوشانده شد. گستره باکتری پس از شستشو با آب و خشک شدن، با میکروسکوپ نوری و بزرگنمایی ۱۰۰۰x مورد بررسی قرار گرفت.

برای تهیه محلول کوماسی بلو، ابتدا پودر کوماسی (۰/۲۵ گرم) درون اتانول (۵۰ میلی‌لیتر) حل و روی حرارت ملایم قرار داده شد. سپس اسید استیک (هفت میلی‌لیتر) به محلول اضافه و در داخل آب دوبار تقطیر (۵۰ میلی‌لیتر) حل شد. محلول تهیه شده از کاغذ صافی عبور داده شد تا ناخالصی‌های آن جدا شوند.

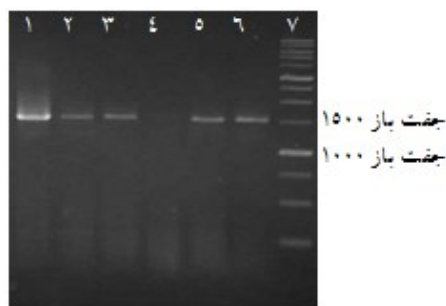
ه) واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و توالی‌یابی: برای شناسایی ژن ۱۶S rDNA در جدایه‌های بومی باکتری باسیلوس تورینجینسیس از جفت آغازگر ۱۶S ITS rDNA شامل توالی رفت (*forward*)، AGAGTTTGATCCTGGCTCAG و توالی برگشت (*reverse*)، CAAGGCATCCACCGT، استفاده شد (شرکت پیشگام، ایران) (۱۱). برنامه واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای آغازگر ۱۶S rDNA به این شرح بود: یک مرحله واسرشت‌سازی (*denaturation*) اولیه به مدت چهار دقیقه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس، یک مجموعه برنامه برای ۳۵ دور با یک دور شامل واسرشت‌سازی مجدد در ۹۴ درجه سلسیوس برای یک دقیقه، اتصال آغازگر (*annealing*) در دمای اختصاصی آغازگر (فوروارد ۵۶ و ریورس ۵۲ درجه سلسیوس) برای یک دقیقه و گسترش (*extension*) در ۷۲ درجه سلسیوس برای یک دقیقه و گسترش نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس برای پنج دقیقه. محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای هر پنج جدایه باکتری با روش سنگر (*sanger*) توالی‌یابی (شرکت پیشگام، ایران) انجام گرفت و توالی‌های به‌دست آمده در بانک ژن ثبت شدند.

و) بررسی روابط فیلوژنتیک جدایه‌های بومی باکتری باسیلوس

جدایه، اندازه توالی باکتری‌های بومی باسیلوس تورینجینسیس را ارایه کرد که مطابق جدول ۱ در بانک ژن ثبت شدند.



شکل ۲: شکل‌های مختلف بلورهای پروتئینی مشاهده‌شده در جدایه‌های بومی: الف) کروی (CS)؛ ب) مکعبی (CC)؛ ج) نامنظم (CI)؛ د) دوهرمی (CB). Sp: اسپور.



شکل ۳: الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگر *16S rDNA* با ژل آگارز یک درصد. ستون‌های یک تا هفت از سمت چپ به راست به ترتیب نمونه‌های ۱۰۰۱، ۱۰۱۹، ۱۰۲۰، کنترل منفی، ۱۰۳۹، ۱۰۹۱ و مارکر ۱kb

جدول ۱: مشخصات پنج جدایه بومی باسیلوس تورینجینسیس ثبت شده در بانک ژن.

ردیف	نام جدایه باکتری	اندازه توالی به دست آمده (جفت باز)	رس شماره (Accession No.)
۱	۱۰۰۱	۱۴۴۶	MW581923
۲	۱۰۱۹	۱۴۵۰	MW485925
۳	۱۰۲۰	۱۳۸۹	MW512500
۴	۱۰۳۹	۱۴۵۰	MW512501
۵	۱۰۹۱	۷۶۴	MW486654

تجزیه و تحلیل شدند (۱۷). این پایگاه روابط فیلوژنتیکی هر توالی را کاملاً مشخص می‌کند. سپس، درخت فیلوژنتیک توالی ژن هر جدایه بومی به همراه توالی ژن سایر گونه‌های باکتری رسم شد.

### یافته‌ها

الف) جداسازی جدایه‌های بومی باسیلوس تورینجینسیس: پس از کشت باکتری و تهیه تک‌کلنی، محیط‌های کشت باکتری بررسی و کلنی‌های مشابه باکتری باسیلوس تورینجینسیس بر اساس شکل ظاهری یعنی کلنی‌های کرم یا سفید رنگ با حاشیه گرد انتخاب شدند (شکل ۱). نمونه‌های باسیلوس تورینجینسیس انتخابی شامل ۱۰۰۱، ۱۰۱۹، ۱۰۲۰، ۱۰۳۹ و ۱۰۹۱ بودند.



شکل ۱: نمونه‌ای از کشت خالص سازی‌شده باسیلوس تورینجینسیس.

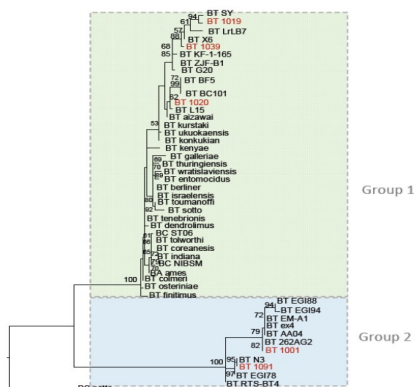
ب) بررسی جدایه‌های بومی باسیلوس تورینجینسیس با رنگ‌آمیزی گرم و کوماسی بلو: نتیجه رنگ‌آمیزی نشان داد تمام نمونه‌های باکتری گرم مثبت بودند. در ادامه کریستال‌ها با روش رنگ‌آمیزی کوماسی بلو مطالعه شدند.

بلورهای پروتئینی در نمونه‌های ۱۰۰۱، ۱۰۱۹، ۱۰۲۰، ۱۰۳۹ و ۱۰۹۱ به ترتیب به اشکال کروی-مکعبی-نامنظم، دوهرمی-کروی، کروی-مکعبی، کروی-دوهرمی-نامنظم و کروی-مکعبی-نامنظم مشاهده شد (شکل ۲).

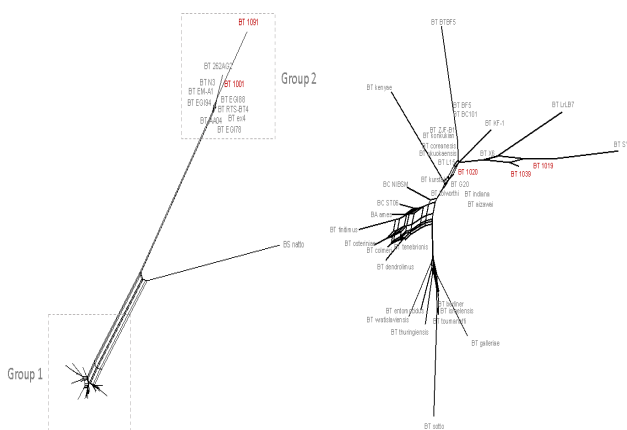
ج) واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و توالی‌یابی: نتیجه الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگر *16S rDNA* با ژل آگارز یک درصد در شکل ۳ قابل مشاهده است. تعیین توالی محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز هر

*Bt 1019*, *Bt 1020* و *Bt 1039* در گروه اول و دو جدایه *Bt 1001* و *Bt 1091* در گروه دوم قرار گرفتند.

ه) بررسی نواحی حفظ شده (*motifs*) در توالی‌های نوکلئوتیدی ژن *rDNA* ۱۶S در جدایه‌های بومی باسیلوس تورینجینسیس: بهترین مدل انتخاب شده بر اساس معیار اطلاعاتی BIC مدل HKY+F+I+G4 بود. بر اساس بررسی انجام شده از ۱۶۰۰ کاراکتر موجود در ۴۸ توالی مورد بررسی (توالی پنج جدایه بومی *Bt* و ۴۳ جدایه از باکتری‌های هم‌گروه) تعداد ۱۳۸۲ کاراکتر (۸۶/۴۰ درصد) به صورت ثابت و بقیه متغیر بودند. برای مشاهده الگوی حفظ شده توالی‌های مورد بررسی، توالی‌های همردیف سازی شده با برنامه وپلوگو در شکل ۶ به تصویر کشیده شده‌اند. در این شکل سه ناحیه حفظ شده در باکتری‌های بومی به صورت C1، C2 و C3 مشخص شدند.



شکل ۴: درخت فیلوژنتیک رسم شده با برنامه آی کیو-تری برای ۴۳ جدایه به دست آمده از بانک ژن همراه با جدایه‌های بومی و باکتری باسیلوس سوبتیلیس زیرگونه ناتو به عنوان خارج گروه. میله افقی نشان دهنده اختلاف ۰/۰۲ درصدی در شباهت‌های نوکلئوتیدی می‌باشد.



شکل ۵: شبکه فیلوژنتیک رسم شده با برنامه اسپلیتس تری.

د) بررسی روابط فیلوژنتیک جدایه‌های بومی باسیلوس تورینجینسیس: توالی‌های مورد نظر در این پژوهش پس از بررسی با بلاستان (BLASTN) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. همان‌گونه که در جدول ۲ ملاحظه می‌شود، پنج جدایه مورد بررسی در این پژوهش بر اساس توالی نوکلئوتیدی به میزان ۹۲/۰۶ تا ۹۹/۹۳ درصد با یکدیگر شباهت داشتند. همچنین، این پنج جدایه به میزان ۹۹/۷۳ تا ۱۰۰ درصد با سایر جدایه‌های موجود در بانک ژن متعلق به باسیلوس تورینجینسیس شباهت نشان دادند (جدول ۳).

جدول ۲: درصد تشابه پنج جدایه بومی باسیلوس تورینجینسیس با یکدیگر.

جدایه باکتری	<i>Bt 1001</i>	<i>Bt 1019</i>	<i>Bt 1020</i>	<i>Bt 1039</i>	<i>Bt 1091</i>
<i>Bt 1001</i>	۱۰۰				
<i>Bt 1019</i>	۹۴/۱۶	۱۰۰			
<i>Bt 1020</i>	۹۴/۰۴	۹۹/۸۶	۱۰۰		
<i>Bt 1039</i>	۹۴/۰۴	۹۹/۷۹	۹۹/۹۳	۱۰۰	
<i>Bt 1091</i>	۹۹/۲۱	۹۲/۲۲	۹۲/۲۲	۹۲/۰۶	۱۰۰

جدول ۳: درصد تشابه پنج جدایه باکتری بومی با سایر جدایه‌های باسیلوس تورینجینسیس.

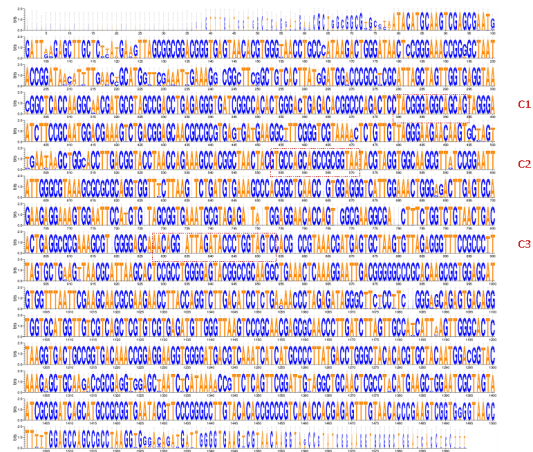
جدایه‌های بومی باکتری	نتایج حاصل از BLAST			
جدایه	اندازه	رس شمار	نام جدایه	درصد
<i>Bt 1001</i>	۱۴۴۶	KF836519	<i>Bt 262AG2</i>	۹۹/۹۳
<i>Bt 1019</i>	۱۴۵۰	KY974313	<i>Bt SY</i>	۱۰۰
<i>Bt 1020</i>	۱۴۵۰	MG266322	<i>Bt KF-1</i>	۱۰۰
<i>Bt 1039</i>	۷۶۴	MT706014	<i>Bt BF5</i>	۹۹/۷۳
<i>Bt 1091</i>	۱۳۸۹	KJ524503	<i>Bt RTS-BT4</i>	۹۹/۹۳

روابط فیلوژنتیکی با استفاده از درخت و شبکه فیلوژنتیکی به ترتیب در شکل‌های ۴ و ۵ نشان داده شده‌اند. نتایج حاصل از طبقه‌بندی جدایه‌های مورد بررسی در دو شکل با یکدیگر مطابقت داشتند. همان‌گونه که ملاحظه می‌شود، جدایه‌های مورد بررسی در دو گروه تک‌نیایی با بوت‌استرپ ۱۰۰ قرار گرفتند. سه جدایه مورد بررسی در این پژوهش با نام‌های

همان‌طورکه در شکل‌های ۷ تا ۱۱ نشان داده شده است، هر کدام از توالی‌های به‌دست آمده در مورد جدایه‌های بومی با یک سری از گونه‌های باکتریایی ثبت‌شده در بانک ژن متعلق به خانواده باسیلاسه (Bacillaceae) بیشترین شباهت را داشتند.

توالی جدایه *Bt 1001*، بیشترین نزدیکی و کمترین فاصله را با گونه باسیلوس فریگورتولرانس (*B. frigoritolerans*) داشت (شکل ۷). درخت فیلوژنتیک رسم شده دیگر نشان داد که توالی ژن ۱۶S rDNA متعلق به گونه باسیلوس آنتراسیس (*B. anthracis*) به توالی *Bt 1019* نزدیک است (شکل ۸).

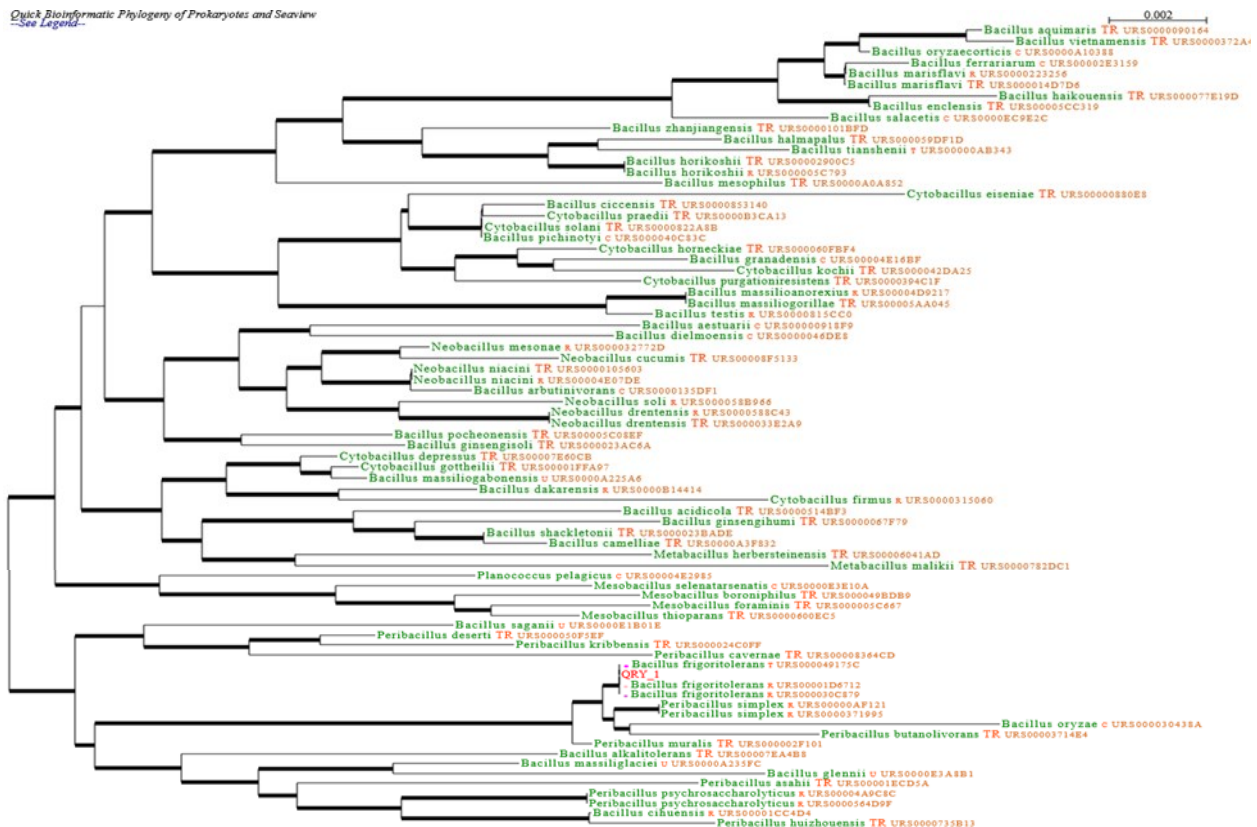
توالی جدایه *Bt 1020* بیشترین نزدیکی و کمترین فاصله را با گونه باسیلوس سرئوس داشت (شکل ۹). در مورد توالی جدایه *Bt 1039* علاوه بر گونه باسیلوس سرئوس، کمترین فاصله با گونه باسیلوس مارکورستینکتوم (*B. marcorestinctum*) مشاهده شد (شکل ۱۰). مشابه جدایه *Bt 1001*، توالی باکتری *Bt 1091* نیز بیشترین شباهت و نزدیکی را با گونه باسیلوس فریگورتولرانس نشان داد (شکل ۱۱).



شکل ۶: تصویرسازی توالی‌های هم‌مدیف سازی‌شده جدایه‌های باسیلوس تورینجینسیس با برنامه وب لوگو.

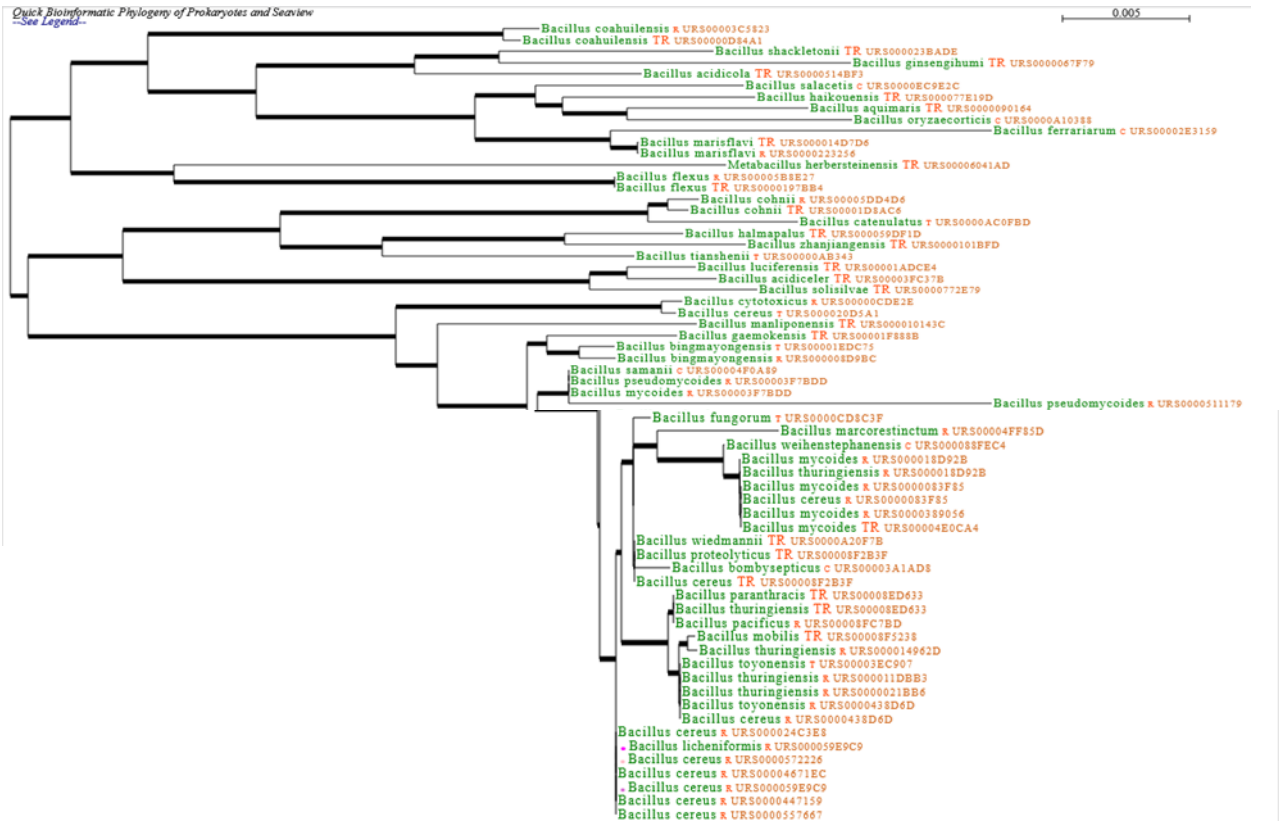
(و بررسی روابط فیلوژنتیک جدایه‌های بومی باسیلوس تورینجینسیس با سایر گونه‌های باکتری: به کمک پایگاه اطلاعاتی-محاسبه‌ای leBIBI<sup>QBPP</sup> پنج توالی ژن *S* ۱۶rDNA متعلق به جدایه‌های بومی (*Bt 1001*، *Bt 1019*، *Bt 1020*، *Bt 1039* و *Bt 1091*) تجزیه و تحلیل شدند.

Quick Bioinformatic Phylogeny of Prokaryotes and Seaview  
-See Legati-



شکل ۷: درخت فیلوژنتیک رسم‌شده با استفاده از leBIBI<sup>QBPP</sup> مربوط به توالی جدایه *Bt 1001*.

دنیای میکروب‌ها، سال پانزدهم شماره اول بهار ۱۴۰۱. مطالعه بیوانفورماتیک باسیلوس تورینجینسیس با توالی ژن ۱۶S rDNA. مریم راشکی و همکاران.



شکل ۸: درخت فیلوژنتیک رسم شده با استفاده از leBIBI<sup>QBPP</sup> مربوط به توالی جدایه *Bt 1019*.

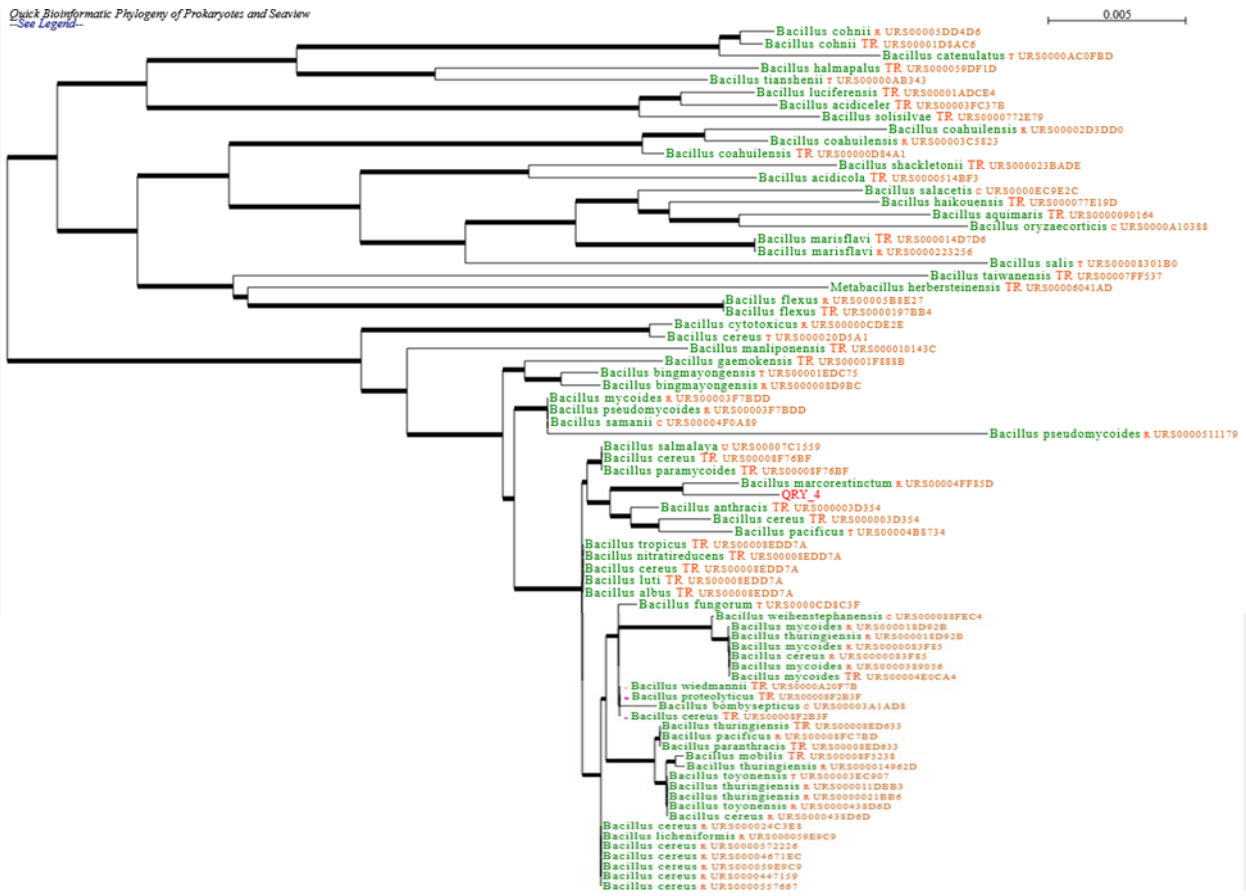


شکل ۹: درخت فیلوژنتیک رسم شده با استفاده از leBIBI<sup>QBPP</sup> مربوط به توالی جدایه *Bt 1020*.



دنیای میکروبا، سال پانزدهم شماره اول بهار ۱۴۰۱. مطالعه بیوانفورماتیک باسیلوئوس تورینجینسیس با توالی ژن ۱۶S rDNA. مریم راشکی و همکاران.

Quick Bioinformatic Phylogeny of Prokaryotes and Seaview  
See Legend.



شکل ۱۰: درخت فیلوژنتیک رسم شده با استفاده از leBIBI<sup>QBPP</sup> مربوط به توالی جدایه *Bt 1039*.

Quick Bioinformatic Phylogeny of Prokaryotes and Seaview  
See Legend.



شکل ۱۱: درخت فیلوژنتیک رسم شده با استفاده از leBIBI<sup>QBPP</sup> مربوط به توالی جدایه *Bt 1091*.

## بحث

بین ۹۲/۰۶ تا ۹۹/۹۳٪ بود. گروه باکتری باسیلوس سرئوس شامل گونه‌های باسیلوس سرئوس، باسیلوس آنتراسیس، باسیلوس تورینجینسیس و باسیلوس میکوایدس است (۲۲). با این وجود، جدایه‌های بومی بررسی شده بر اساس توالی ژن *16S rDNA* با سایر زیرگونه‌های باسیلوس تورینجینسیس ثبت شده در بانک ژن از ۷۳/۹۹ تا ۱۰۰ درصد شباهت نشان دادند که این زیرگونه‌ها عبارتند از: *Bt KF-1*، *BT SY*، *Bt 262AG2*، *Bt BF5* و *Bt RTS-BT4* در تحقیقی دیگر بر اساس ژن *16S rDNA* میزان شباهت باکتری باسیلوس تورینجینسیس با سایر باکتری‌های هم‌گروهش بیش از ۹۹ درصد بود (۲۳).

البته، قابل ذکر است که باسیلوس تورینجینسیس تنها با تولید بلورهای سم از سایر باکتری‌های هم‌گروهش قابل تفکیک است و با استفاده از آغازگرهای ویژه توالی‌های ژن دلتا-توکسین (delta-toxin) شناسایی می‌شود (۲۴). به این دلیل، محققین با استفاده از پروب‌های دی‌ان‌ای بر اساس نواحی مختلف *16S rDNA* به‌عنوان روشی سریع توانستند دو گونه نزدیک به هم یعنی باسیلوس سرئوس و باسیلوس تورینجینسیس را از یکدیگر متمایز و شناسایی کنند (۲۵). بدین صورت که، توالی‌های هر دو گونه با هم مقایسه شدند و مشاهده شد که ناحیه VI حاوی متغیرهای کافی است تا قادر به طراحی پروب‌های DNA باشد و باعث تمایز این دو گونه شود. در مطالعه نام برده، جدایه‌های باسیلوس سرئوس به‌دست آمده از محیط‌های مختلف شناسایی و با آزمایش‌های بیوشیمیایی و پروفایل‌های واکنش زنجیره‌ای پلیمرز بررسی شدند و تعداد نه جدایه به‌عنوان گونه باسیلوس سرئوس تأیید شدند و با آزمایش‌های کلاسیک شناسایی مطابقت داشتند. حتی جدایه‌هایی که با روش‌های معمول به‌عنوان باسیلوس سرئوس شناسایی نشده بودند با روش توالی‌یابی در گروه باسیلوس سرئوس قرار گرفتند و شش جدایه که در گذشته باسیلوس سرئوس معرفی شده بودند، در حقیقت با روش توالی‌یابی به‌عنوان باسیلوس تورینجینسیس شناسایی شدند (۲۵). در مطالعه حاضر، سه ناحیه حفظ شده در باکتری‌های بومی باسیلوس تورینجینسیس به‌صورت C1، C2 و

در این تحقیق، رابطه فیلوژنتیک جدایه‌های بومی باکتری باسیلوس تورینجینسیس با استفاده از تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، توالی‌یابی و ابزارهای بیوانفورماتیک بررسی شد. بدین ترتیب، توالی ژن‌های *16S rDNA* متعلق به پنج جدایه بومی با یکدیگر و با تعدادی از توالی‌های ثبت شده از این گونه در بانک ژن مقایسه و روابط فیلوژنتیک این جدایه‌ها تعیین شدند. به کمک پایگاه اطلاعاتی-محاسبه‌ای leBIBI<sup>QBPP</sup> روابط فیلوژنتیکی این جدایه‌های بومی با سایر گونه‌های جنس باسیلوس نیز مقایسه شدند. جدایه‌های مورد بررسی در دو گروه تک‌نیایی جای گرفتند. سه جدایه مورد بررسی در این پژوهش با نام‌های *Bt 1019*، *Bt 1020* و *Bt 1039* در گروه اول و دو جدایه *Bt 1001* و *Bt 1091* در گروه دوم قرار داشتند.

نمونه‌های مورد بررسی در این پژوهش، از خاک مناطق مرتعی، جنگلی و باغی با اقلیمی خشک و نیمه خشک جمع‌آوری شدند. اما، برخی محققان از سطح بدن حیوانات و مدفوع آن‌ها نیز نمونه‌برداری کردند که بستر مناسبی برای نمونه‌برداری باکتری باسیلوس تورینجینسیس بوده است (۱۸ و ۱۹ و ۲۰).

تمایز میان گونه‌های باسیلوس دشوار است و آزمایش‌های شکل‌شناسی متعددی برای این منظور انجام شده است (۲۱). در تحقیق حاضر، بعد از رنگ‌آمیزی بلورهای باکتری‌های باسیلوس با کوماسی بلو و مشاهده توسط میکروسکوپ فازکنتراست، بلورهای سم که مختص باکتری باسیلوس تورینجینسیس هستند مشاهده و مشخص شد که بیشترین فراوانی مربوط به شکل بلورهای کروی بود. البته شکل‌های مکعبی، دوهرم و اشکال نامنظم نیز مشاهده شدند. در بررسی جدایه‌های مختلف باکتری باسیلوس تورینجینسیس در شرق آسیا، بیشترین فرم و شکل کریستال پروتین را هرمی و کروی گزارش کردند (۱۰) که با یافته‌های تحقیق حاضر مطابقت نشان داد.

بررسی با ابزار بلاست در بانک ژن بر اساس توالی ژن *16S rDNA* نشان داد که پنج جدایه باکتری باسیلوس تورینجینسیس مورد بررسی در این مطالعه در گروه باکتری باسیلوس سرئوس قرار داشتند و شباهت پنج جدایه با یکدیگر

شباهت نشان می‌دهند (۲۷). مشابه تحقیق حاضر، بررسی توالی‌یابی ژن یک جدایه هندی، شباهت بالایی با باکتری باسیلوس سرئوس و باسیلوس تورینجینسیس نشان داد (۲۸). تجزیه و تحلیل دندروگرام نشان‌دهنده که تمام جدایه‌های باسیلوس تورینجینسیس که از حشرات مرده جدا شده بودند رابطه نزدیکی با باسیلوس تورینجینسیس زیرگونه کورستاکی دارند بجز Bt-64 که از زیرگونه کورستاکی فاصله زیادی داشت (۲۹). اما در تحقیق حاضر، جدایه‌های گروه اول فاصله زیادی از نظر فیلوژنتیک با جدایه باسیلوس تورینجینسیس زیرگونه کورستاکی نشان ندادند. در تحقیقی، روابط تکاملی بر اساس سایر ژن‌های مربوط به باسیلوس تورینجینسیس نیز بررسی شدند. به‌طورمثال، جدایه‌های مطالعه شده بر اساس توالی ژن *gyrB*، شباهت زیادی با زیرگونه‌های باسیلوس تورینجینسیس زیرگونه فینیتیموس (*Bt subspecies finitimus*) و زیرگونه آیزاوی (*Bt subspecies aizawai*) نشان دادند (۳۰). در تحقیق حاضر، روابط فیلوژنتیک هر کدام از جدایه‌های بومی باسیلوس تورینجینسیس نیز با سایر گونه‌های باکتری‌ها با استفاده از leBIBI<sup>QBPP</sup> بررسی شد. نتایج نشان داد که هر جدایه بر اساس توالی ژن *16S rDNA* به کدام گونه باکتری شباهت بیشتری داشته‌است. توالی جدایه Bt 1001، بیشترین نزدیکی و کمترین فاصله را با گونه باسیلوس فریگوریتولرانس داشت. گونه باسیلوس فریگوریتولرانس به‌عنوان بیمارگر دو گونه از سخت‌بالپوشان خانواده اسکارابئید (Scarabaeidae) معرفی شده است (۳۱). بدین‌وسیله، پیش‌بینی می‌شود که جدایه Bt 1001 هم بتواند علیه راسته سخت‌بالپوشان سمی باشد که برای این منظور باید آزمون زیست‌سنجی تعیین بیماری‌گری انجام شود. درخت فیلوژنتیک رسم شده دیگر نشان داد که توالی ژن *S 16rDNA* متعلق به گونه باسیلوس آنتراسیس به توالی Bt 1019 نزدیک است. توالی جدایه Bt 1020 بیشترین نزدیکی و کمترین فاصله را با گونه باسیلوس سرئوس داشت. در مورد توالی جدایه Bt 1039 علاوه بر گونه باسیلوس سرئوس، کمترین فاصله با گونه باسیلوس مارکورستینکتوم مشاهده شد. گونه باسیلوس مارکورستینکتوم بر اساس توالی ژن *16S rDNA*، با

C3 به ترتیب با توالی‌های GTACGGGAGGCAGCAG، AACAGGATTAGA و GTGCCAGCAGCCGCGGTAA TACCCTGGTA مشخص شد؛ به‌طوری که، در ناحیه حفاظ شده سوم، توالی TTAGATACCT در تمام باکتری‌ها به صورت ثابت وجود داشت. سه ناحیه C1، C2 و C3 به ترتیب حاوی ۱۶، ۱۹ و ۲۵ نوکلئوتید بودند و نوکلئوتید غالب در سه ناحیه به ترتیب گوانین، گوانین و آدنین شناسایی شد. این نواحی حفظ شده در میان‌کنش با پروتین‌های زیر واحدهای ریوزومی نقش مهمی دارند که طی تکامل حفظ شده‌اند و هر گونه تغییر در این نواحی باعث غیر فعال شدن ریوزوم خواهد شد. البته این پیش‌بینی نیاز به اطلاعات کریستالوگرافی و مطالعات بیوانفورماتیک بیشتر دارد.

همچنین، بررسی روابط فیلوژنتیک باکتری‌های بومی بر اساس ژن *16S rDNA* نشان داد که این جدایه‌ها شباهت و رابطه نزدیک‌تری با باکتری باسیلوس تورینجینسیس داشتند و از دو گونه هم‌گروه دیگر یعنی باسیلوس سرئوس و باسیلوس آنتراسیس دارای فاصله بیشتری بودند. جدایه‌های مورد بررسی در دو گروه تک‌نمایی جای گرفتند. سه جدایه مورد بررسی در این پژوهش با نام‌های Bt 1019، Bt 1020 و Bt 1039 در گروه اول و دو جدایه Bt 1001 و Bt 1091 در گروه دوم قرار داشتند. نزدیک‌ترین خوشه به گروه اول شامل زیرگونه‌های شناخته شده شامل باسیلوس تورینجینسیس زیرگونه آیزاوی (*Bt subspecies aizawai*) و باسیلوس تورینجینسیس زیرگونه کورستاکی (*Bt subspecies kurstaki*) بود که این زیرگونه‌ها علیه حشرات راسته بالپولکداران سمی هستند (۲۶).

در مطالعه مشابهی، بررسی ژن *16S rDNA* در جدایه SY49.1 شباهت ۹۸٪ با دو زیرگونه از باکتری باسیلوس تورینجینسیس شامل آندالوسینسیس BGSC4AW1 (*andalousiensis* BGSC 4AW1) و مونتری (BGSC 4AJ1 (*monterrey* BGSC 4AJ1) نشان داد (۱۱). بررسی ژن مذکور در جدایه‌های بومی توسط محققان نشان داد که جدایه بیمارگر، Bt63، دارای رابطه بسیار نزدیک با زیرگونه باسیلوس تورینجینسیس زیرگونه اسرلنسیس (*Bt subspecies israelensis*) است و تمام جدایه‌ها با هم

### نتیجه گیری

در تحقیق حاضر، بلورهای پروتینی در باکتری‌های بومی مشاهده شد. این بلورهای سم تنها توسط باکتری باسیلوس تورینجینسیس تولید می‌شوند. انجام بلاست و همترازی توالی ژن *16S rDNA* در جدایه‌های بومی نیز بیشترین شباهت را به باکتری‌های باسیلوس تورینجینسیس ثبت شده در بانک ژن نشان داد. همچنین نتایج پیش‌بینی کرد که سه جدایه بومی *Bt 1019*، *Bt 1020* و *Bt 1039* علیه آفات متعلق به راسته بالپولکداران و دو جدایه *Bt 1001* و *Bt 1091* علیه آفات سخت‌بالپوش می‌توانند سمی باشند.

### ملاحظات اخلاقی

نویسندگان تمامی نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده‌ها و داده‌سازی را در این مقاله رعایت کرده‌اند.

### تشکر و قدردانی

این پژوهش در قالب طرح پژوهشی شماره ۷/۹۹/۵۱۷/ص با استفاده از اعتبارات پژوهشی پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران انجام شده‌است.

### تعارض در منافع

وجود ندارد.

شباهت ۹۶/۵ درصد به گونه‌های باسیلوس آنتراسیس و باسیلوس تورینجینسیس بسیار نزدیک است (۳۲).

مشابه جدایه *Bt 1001*، توالی باکتری *Bt 1091* نیز بیشترین شباهت را با گونه باسیلوس فریگوریتولرانس نشان داد که برای این جدایه بومی نیز بیمارگری علیه حشرات سخت‌بالپوش دور از انتظار نیست. بررسی روابط فیلوژنتیکی میان جدایه‌های بومی نیز نشان دهنده رابطه نزدیک این دو جدایه بود.

توالی نوکلئوتیدی *16S rDNA* در گروه باسیلوس سرئوس سطوح بسیار بالایی از شباهت توالی را میان اعضاء نشان می‌دهد (۳۳). توالی‌های *16S rDNA* متعلق به باسیلوس مایکروایدس و باسیلوس تورینجینسیس از یکدیگر و از توالی‌های باسیلوس آنتراسیس و باسیلوس سرئوس از چهار تا نه نوکلئوتید متفاوت هستند (۲۲). جدایه‌های باسیلوس سرئوس در دماهای بین چهار تا ۳۷ درجه سلسیوس رشد می‌کنند و جدایه‌های سرمادوست (psychrotrophs) می‌توانند به هر دو حالت هوازی و بی‌هوازی سم داخلی (enterotoxin) تولید کنند (۳۴). این ویژگی در جدایه‌های گونه باسیلوس تورینجینسیس نیز مشاهده می‌شود. اما گونه باسیلوس سرئوس دارای فعالیت همولیتیک (hemolytic activity) است که در گونه‌های دیگر گروه از جمله باسیلوس تورینجینسیس دیده نمی‌شود (۳۵). همچنین، برخلاف باکتری باسیلوس تورینجینسیس کریستال سم در سایر گونه‌های هم‌گروه تولید نمی‌شود.

به منظور افزایش دقت و سرعت شناسایی گونه‌های مختلف باکتری‌های جنس باسیلوس به‌خصوص گونه‌های موجود در گروه باسیلوس سرئوس که دارای رابطه نزدیک با یکدیگر هستند، پیشنهاد می‌شود علاوه بر تجزیه و تحلیل توالی *S* *16rDNA*، از ژن *gyrB* به‌عنوان یک مارکر مولکولی تشخیصی نیز استفاده شود. به‌دلیل اینکه نتیجه واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ژن مذکور مطابق با تکنیک پروب هیبریداسیون بر پایه *16S rDNA* است، این روش ساده واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، ابزاری قدرتمند برای تأیید و تفکیک گونه‌های این گروه در تمامی نمونه‌های جمع‌آوری شده خواهد بود.

## References

1. Ibarra JE, Del Rincon MC, Orduz S, Noriega D, Benintende G, Monnerat R, Regis L, De Oliveira CM, Lanz H, Rodriguez MH, Sanchez J, Pena G, Bravo A. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Latin America with insecticidal activity against different mosquito species. *Appl Environ Microbiol.* 2003; 69: 5269-5274.
2. Crickmore N, Zeigler DR, Schnepf E, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Bravo A, Dean DH. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2004; 62 (3): 807–813.
3. Nazarian A, Jahangiri R, Salehi Jouzani Gh, Seifinejad A, Soheilivand S, Bagheri O, Keshavarzi M, Alamisaeid Kh. Coleopteran-specific and putative novel cry genes in Iranian native *Bacillus thuringiensis* collection. *J invertebr pathol.* 2009; 102: 101-109.
4. Beron CM, Curatti L, Salerno GL. New strategy for identification of novel cry-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains. *Appl Environ Microbiol.* 2005; 71 (2): 761–765.
5. Tamez-Guerra P, Damas G, Iracheta MM, Oppert B, Gomez-Flores R, Rodriguez-Padilla C. Differences in susceptibility and physiological fitness of Mexican field *Trichoplusia ni* strains exposed to *Bacillus thuringiensis*. *J Econ Entomol.* 2006; 99: 937–945.
6. Woo PCY, Lau SKP, Teng JLL, Tse H, Yuen KY. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clin Microbiol Infect.* 2008; 14: 908-934.
7. Goto K, Jiang W, Zheng Q, Oku Y, Kamiya H, Itoh T, Ito M. Epidemiology of *Helicobacter* infection in wild rodents in the Xinjiang-Uygur autonomous region of China. *Curr Microbiol.* 2004; 49: 221-223.
8. Ticknor LO, Kolstø AB, Hill KK, Keim P, Laker MT, Tonks M, Jackson PJ. Fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis of Norwegian *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* soil isolates. *Appl Environ Microbiol.* 2001; 67:4863-73.
9. Devulder G, Perrière G, Baty F, Flandrois JP. BIBI, a bioinformatics bacterial identification tool. *J Clin Microbiol.* 2003; 41: 1785–1787.
10. Travers RS, Martin PAW, Reichelderfer CF. Selective process for efficient isolation of soil *Bacillus* spp. *Appl Environ Microbiol.* 1987; 53(6): 1263-1266.
11. Yılmaz S, Ayvaz A, Akbulut M, Azizoglu U, Karabörklü S. A novel *Bacillus thuringiensis* strain and its pathogenicity against three important pest insects. *J Stored Prod Res.* 2012; 51: 33-40.
12. Katoh K, Standley DM. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol.* 2013; 30: 772-780.
13. Maddison W, Maddison D. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.10. 2015; Available from: <http://mesquiteproject>.

14. Nguyen LT, Schmidt HA, Von Haeseler A, Minh BQ. IQ-TREE, A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Mol Biol Evol.* 2015; 32: 268-274.
15. Huson DH, Bryant D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol Biol Evol.* 2006; 23(2): 254-267.
16. Crooks GE, Hon G, Chandonia JM, Brenner SE. WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res.* 2004; 14(6): 1188-1190.
17. Flandrois JP, Perrière G, Gouy M. leBIBIQBPP: a set of database and a webtool for automatic phylogenetic analysis of prokaryotic sequences. *BMC Bioinformatics.* 2015; 16, 10.1186/s12859-015-0692-z.
18. Forsyth G, Logan NA. Isolation of *Bacillus thuringiensis* from Northern Victoria Land, Antarctica. *Appl Microbiol.* 2000; 30: 263-266.
19. Apaydin O, Yenidunya AF, Harsa S, Gunes H. Isolation and characterization of *Bacillus thuringiensis* strains from different grain habitats in Turkey. *World J Microbiol Biotechnol.* 2004; 21: 285-292.
20. Cinar C, Apaydin O, Yenidunya AF, Harsa S, Gunes H. Isolation and characterization of *Bacillus thuringiensis* strains from olive-related habitats in Turkey. *J Appl Microbiol.* 2008; 515-525.
21. Drobniwski FA. *Bacillus cereus* and related species. *Clin Microbiol Rev.* 1993; 6: 324-338.
22. Ash C, Farrow JAE, 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 Evol Microbiol.* 1991; 41:343–346.
23. von Wintzingerode F, Rainey FA, Kroppenstedt RM, Stackebrandt E. Identification of environmental strains of *Bacillus mycoides* by fatty acid analysis and species-specific 16S rDNA oligonucleotide probe. *FEMS Microbiol Ecol.* 1997; 24(3): 201-209.
24. Bourque SN, Valero JR, Mercier J, Lavoie MC, Levesque RC. Multiplex polymerase chain reaction for detection and differentiation of the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Appl Environ Microbiol.* 1993; 59:523-527.
25. te Giffel MC, Beumer RR, Granum PE, Rombouts FM. Isolation and characterisation of *Bacillus cereus* from pasteurized milk in household refrigerators in The Netherlands. *Int J Food Microbiol.* 1997; 34: 307-318.
26. Debode F, Janssen E, Bragard C, Berben G. Detection by real-time PCR and pyrosequencing of the *Cry1Ab* and *Cry1Ac* genes introduced in GM constructs. *Food Addit Contam Part A.* 2017; 34(8): 1-23.
27. El-kersh TA, Al-sheikh YA, Al-akeel RA, Alsayed AA. Isolation and characterization of native *Bacillus thuringiensis* isolates from Saudi Arabia. *Afr J Biotechnol.* 2012; 11(8):1924-1938.

28. Banik A, Chattopadhyay A, Ganguly S, Mukhopadhyay SK. Characterization of a tea pest specific *Bacillus thuringiensis* and identification of its toxin by MALDI-TOF mass spectrometry. *Ind Crops Prod.* 2019; 137: 549-556.
29. Camacho-Millána R, Aguilar-Medina EM, Quezada H, Medina-Contreras Ó, Patino-López G, Cárdenas-Cota, HM, Ramos-Payán R. Characterization of Cry toxins from autochthonous *Bacillus thuringiensis* isolates from Mexico. *Bol Med Hosp Infant Mex.* 2017; 74(3): 193-199.
30. Elleuch J, Tounsi S, B Ben Hassen, N, Lacoix MN, Chandre F, Jaoua S, Zghal RZ. Characterisation of novel *Bacillus thuringiensis* isolates against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephridae). *J Invertebr Pathol.* 2015; 124: 90-97.
31. Selvakumar G, Sushi SN, Stanley J, Mohan M. *Brevibacterium frigoritolerans* a novel entomopathogen of *Anomala dimidiata* and *Holotrichia longipennis* (Scarabaeidae: Coleoptera). *Biocontrol Sci Technol.* 2011; 21(7): 821-827.
32. Han Y, Chen F, Li N, Zhu B, Li X. *Bacillus marcorestinum* sp. nov., a novel soil acylhomocerine lactone quorum-sensing signal quenching bacterium. *Int. J. Mol. Sci.* 2010; 11(2): 507-520.
33. Seki T, Chung CK, Mikami H, Oshima Y. Deoxyribonucleic acid homology and taxonomy of the genus *Bacillus*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 1978; 28: 182-189.
34. Granum PE, Brynestad S, Kramer JM. Analysis of enterotoxin production by *Bacillus cereus* from dairy products, food poisoning incidents and non-gastrointestinal infections. *Int J Food Microbiol.* 1993; 17: 269-279.
35. Yamada S, Ohashi E, Agata N, Venkateswaran K. Cloning and Nucleotide Sequence Analysis of *gyrB* of *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, and *B. anthracis* and their application to the detection of *B. cereus* in rice. *Appl Environ Microbiol.* 1999; 65(4): 1483-1490.