ژنتیک نوین
دوره دوازدهم، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۶
صفحه ۳۸۷ - ۳۷۷

تجزیه فنوتیپی و فیلوژنتیک مولکولی باکتری *Bacillus subtilis* MJ01 با استفاده از روش‌های مختلف بر پایه ژنومیکس مقایسه‌ای

Phenotype and molecular phylogenetic analysis of *Bacillus subtilis* MJ01 using different methods based on comparative genomics

تورج رحیمی[۱]، علی نیازی*[۱]، سید محسن تقوی[۲]، اسماعیل ابراهیمی[۱]، شهاب آیت اللهی[۳]، طاهره دیهیمی[۱]

۱- به‌ترتیب دانشجوی دکتری، استاد، دانشیار، دانشجوی دکتری، پژوهشکده بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

۲- استاد، گروه گیاه پزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

۳- دانشیار، گروه مهندسی شیمی و نفت، دانشگاه صنعتی شریف، تهران، ایران

Rahimi T[1], Niazi A[*1], Taghavi SM[2], Ebrahimie E[1], Ayatollahi Sh[3], Deihimi T[1]

1- PhD Student, Professor, Associate Professor, PhD Student, Institute of Biotechnology, Shiraz University, Shiraz, Iran
2- Professor, Department of Crop Protection, Shiraz University, Shiraz, Iran
3- Associate Professor, Department of Chemical and Petroleum Engineering, Sharif University of Technology, Tehran, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Niazi@shirazu.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۵/۱۱/۲۰ - تاریخ پذیرش: ۹۶/۵/۱۷)

چکیده

باکتری گرم مثبت *Bacillus subtilis* MJ01 از خاک‌آلوده به نفت میدان نفتی پازنان به‌منظور استخراج سورفکتین و بهره‌برداری از آن در فرآیند ازدیاد برداشت نفت جداسازی شد. جهت درک بهتر تفاوت‌های این نژاد با سایر باکتری‌های خویشاوند آن، ژنوم این باکتری توالی‌یابی شد.تجزیه و تحلیل ژن *16SrRNA* نژاد MJ01 را در کلاستر *Bacillus subtilis* قرار داد که با نژاد spizizenii TU-B-10 در یک گروه قرار می‌گیرد. نتایج حاصل از تایپینگ توالی چند لوکوسی (MLST) هفت ژن خانه‌دار در نژادهای *B. subtilis* چهار لوکوس ژنی جدید و در یک لوکوس وراونگی کامل را تایید نمود و نشان داد که این باکتری مشابهت زیادی با الگوی پروفایل MLST با زیرگونه spizizenii BGSC3A17 دارد. تجزیه میانگین یکسانی نوکلئوتید بر اساس BLAST (ANIb) با ۱۲ نژاد دیگر از *B. subtilis* نشان داد که ارتباط نزدیکی با سه زیر گونه spizizenii شامل TU-B-10 (۹۹/۱۳ درصد)، NRS231 (۹۶/۵۲ درصد) و W23 (۹۶/۵۲ درصد) دارد. هم‌چنین بر اساس تجزیه انجام شده مشخص شد این باکتری ارتباط نزدیکی با باکتری *Jeotglibacillus marinus* DSM 1297 دارد. جهت پیش‌بینی لیپوپروتئین‌های غیرریبوزومی و ناحیه اپرانی سورفکتین و نواحی محافظت شده اطراف آن از ابزار آنلاین AntiSMASH استفاده شد. مقایسه این اپران و نواحی اطراف آن با ژنوم سایر نژادهای خویشاوند *B. subtilis* MJ01 مشخص کرد که این باکتری از نظر توالی اپران سورفکتین در گروه باکتری‌های زیر گونه spizizenii قرار می‌گیرد. به‌طور خلاصه، تجزیه تلفیقی فیلوژنی و همولوژی DNA با استفاده از ابزارهای ژنومیک مقایسه‌ای این فرضیه را که باکتری نژاد MJ01 علی‌رغم تفاوت‌های خاص نژاد عضوی از گروه باکتری‌های زیر گونه spizizenii باشد را تقویت نمود.

واژه‌های کلیدی

تجزیه فیلوژنی 16SrRNA
ژنوم
میانگین یکسانی نوکلئوتید(ANI)
Bacillus subtilis
MLST

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.3.6.0]

مقدمه

باکتری‌ها در همه محیط‌ها، از خاک گرفته تا سلول‌های یوکاریوتی یافت می‌شوند. گونه‌های محیطی مانند باکتری‌های خاک زی و دریایی، با محیط‌های فقیر از نظر مواد غذایی روبرو هستند. در مقابل، ژنوم باکتری‌های موجود در این محیط‌ها، حاوی چندین ژن تنظیم‌کننده، ژن‌های مقاومت به تنش، و ژن‌های متابولیسمی است که دسته‌های مختلف از ژن‌ها را ایجاد می‌کند که باکتری را قادر می‌سازد به محدودیت‌های مختلف سازگار شود (Bisch et al. 2016) اعضای جنس *Bacillus* شامل باکتری‌های گرم مثبت با محتوی G+C کم و متعلق به خانواده *Bacillaceae* راسته *Bacillales* کلاس *Bacilli* فیلوم *Firmicutes* و دومین *Bacteria* هستند. آن‌ها در دامنه وسیعی از محیط‌ها رشد می‌کنند (Adelskov and Patel 2016) و به‌عنوان عموماً امن (GRAS) در فهرست سازمان غذا و دارو (FDA) در نظر گرفته می‌شوند (Sharma and Satyanarayana 2013). به‌منظور توسعه و کاربرد این باکتری در فرایندهای صنعتی، ژنوم کامل چندین گونه از *Bacillus* توالی یابی شده‌است. اولین باکتری گرم مثبت که کل ژنوم آن توالی‌یابی شد، *B. subtilis* است (Sharma and Satyanarayana 2013). توسعه و ظهور تکنولوژی‌های توالی‌یابی نسل جدید[1] (NGS) باعث فراهم شدن داده‌های ژنومیک صحیح با سرعت بیشتر و هزینه کمتری در مقایسه با گذشته شده‌است (Ali et al. 2013). اخیراً، یک پلت فرم جدید با خوانش‌های بزرگ به‌نام SMRT[2] توسط شرکت Pacific Bioscience معرفی شده‌است که خوانش‌هایی با طول بیش از ۳۰۰۰ جفت‌باز ایجاد می‌کند و در حالتی که خوانش‌های آن بیش از ۱۰۰۰۰ جفت‌باز باشد نقشه‌یابی و سرهم بندی[3] توالی‌ها را تسهیل می‌کند (Ali et al. 2013). این خوانش‌ها گاه می‌توانند سرهم بندی‌هایی با کیفیت بالا ایجاد نماید (Loman and Pallen 2015). در کل، تفسیر ژنوم باکتری‌ها بر پایه همولوژی توالی و اطلاعات انتقالی از ژنوم‌هایی که به‌دقت تفسیر شده‌اند (مرجع) و یا نزدیک‌ترین ژنوم با ژنومی که به تازگی توالی‌یابی شده‌است، قرار دارد (Ali et al. 2013).

بخش از DNA که معمولاً برای رده‌بندی تاکسونومیک باکتری‌ها استفاده می‌شود ژن 16S rRNA است که در بین گونه‌های باکتریایی و برخی آرکئی باکتری‌ها برای تنوع مقایسه می‌شود (Ali et al. 2013). این تکنیک برای آشکار سازی روابط بین گونه‌های خویشاوند بسیار نزدیک *Bacillus* که انشقاق تکاملی محدودی دارند، مناسب نیست و شکست می‌خورد. با توجه به فقدان توان تشخیص دادن ژن‌های 16S rRNA یک نگرش چندفازی و تلفیقی تاکسنومیک که تجزیه توالی 16S rRNA با خصوصیات فنوتیپی و همولوژی DNA-DNA ترکیب می‌شود، توصیه شده است (Zwick et al. 2012).

روش میانگین یکسانی نوکلئوتید (ANI) فاصله ژنتیکی را بین کل ژنوم با استفاده از بهترین جفت شده در BLAST دو طرفه مناطق حفاظت شده اندازه‌گیری می‌کند. ANI یکسانی توالی بین ۹۵ تا ۹۶ درصد را برای مرزبندی گونه مورد استفاده قرار می‌دهد. این مقدار می‌تواند بسته به درجه تنوع بین یک گونه و گونه بعدی متغیر باشد. در صورت وجود داده‌های در دسترس کافی از ANI ژنوم‌های خویشاوند متعلق به یک جنس، الگوریتم کلاستر بندی ترکیبی[4] برای تعیین گونه می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد (Land et al. 2015) یکی دیگر از روش‌های معمول برای ساخت درخت ژنی ارزیابی همزمان چندین ژن نشانگر بنام MLST یا تجزیه توالی چندلوکوسی[5] است. مقایسه MLST در pan ژنوم باکتری *E. coli* و *Shigella* که از ژن‌های خانه‌دار[6] ایجاد شده بود وضوح بهتری نسبت به درخت ایجاد شده بر اساس 16SrRNA نشان داد (Land et al. 2015) باکتری *B. subtilis* MJ01 یک باکتری گرم مثبت، میله‌ای شکل و خاک‌زی است که از خاک‌آلوده به نفت از منطقه میدان نفتی پازنان در استان خوزستان توسط Jahanbani et al. (2015) جداسازی و شناسایی شد. این باکتری به‌دلیل پتانسیل بالقوه تولید سورفکتین و ترشح آن به محیط کشت و همچنین ساختار متفاوت آن نسبت به سایر سورفکتین‌های گزارش شده مورد توجه قرار گرفت (Jahanbai Vashareh 2015).

[1] Next -Generation Sequencing
[2] Single-molecule real time
[3] assembly
[4] Agglomerative culstering
[5] Multi Locus Sequence Analysis
[6] Housekeeping gene

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.3.6.0]

بر اساس مطالعات Jahanbani et al. (2015) ساختار سورفکتین تولید شده توسط باکتری *B. subtilis MJ01* علی‌رغم مشابهت طیف FTIR مادون قرمز باند کششی با الگوهای FTIR گزارش شده قبلی برای این ماده، الگوهای متفاوتی در آزمون HNMR و در آزمون CNMR از خود نشان داد که این موضوع را دلیل بر تفاوت در ساختار سورفکتین تولید شده توسط این باکتری دانسته‌اند.

از آنجایی‌که باکتری *B. subtilis* یک موجود مدل برای باکتری‌های گرم مثبت شناخته شده‌است و از طرفی تفاوت‌ها و تمایزهای باکتری نژاد MJ01 با سایر باکتری‌های *B. subtilis*، آن را به‌عنوان یک هدف در مطالعات ژنومیک و شناسایی مکانیسم‌های دخیل در تولید سورفکتین و دست‌ورزی‌های ژنتیکی در آینده تبدیل نمود. از این رو پروژه توالی‌یابی ژنوم این باکتری در پژوهشکده بیوتکنولوژی دانشگاه شیراز در تکمیل تحقیقات گروه پژوهشی دانشگاه صنعتی شریف طراحی و اجرا شد. تفاوت گزارش شده در ساختار سورفکتین تولیدی توسط *B. subtilis* MJ01 و توالی‌یابی ژنوم آن زمینه‌ای را برای بررسی ساختار اپران تولیدکننده سورفکتین در این باکتری و شناسایی تفاوت‌ها در سطح ژنوم ایجاد نموده است. از این رو این مطالعه با هدف شناسایی دقیق رده‌بندی تاکسنومیکی *B. subtilis* MJ01 و مقایسه ژنومیک اپران سورفکتین تولید شده توسط *B. subtilis* MJ01 با سایر ژنوم‌های خویشاوند نزدیک آن از طریق روش تلفیقی رده‌بندی تاکسنومیکی و ابزارهای مختلف در این زمینه انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

باکتری *B. subtilis MJ01* از خاک‌آلوده به نفت از میدان نفت پازنان واقع در استان خوزستان توسط Jahanbani et al. (2015) جداسازی شده‌است. این باکتری در کلکسیون باکتری پژوهشکده بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز نگهداری و جهت مطالعات بعدی مورد استفاده قرار گرفت. توالی ژنوم این باکتری با شماره دسترسی CP-018173 در پایگاه داده NCBI ذخیره شده‌است. توالی ژنوم تفسیر شده توسط پلت فرم MicroScope به آدرس اینترنتی www.genoscope.cns.fr/agc/microscope برای تفسیر و کشف خصوصیات ژنوم *B. subtilis MJ01* مورد استفاده قرار گرفت (D Vallenet et al. 2009; David Vallenet et al. 2013). پس از انجام تجزیه‌های تلفیقی و شناسایی نژادهای خویشاوند نزدیک با *B. subtilis MJ01*، توالی سایر ژنوم‌های نژادهای *B. subtilis* به‌همراه تفسیر توالی ژنومی آن‌ها از پایگاه داده NCBI دانلود و استفاده شد.

به‌منظور استخراج ماده موثره سورفکتین و تایید تولید آن توسط باکتری MJ01 از روش بهینه شده زیر استفاده شد. باکتری MJ01 در محیط کشت LB مایع و در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲٤ ساعت پیش کشت شد، سپس محیط کشت MSSO با ترکیبات (K_2HPO_4 (۲۰/۸۵ g/L)، (KH_2PO_4 (۸/۱ g/L)، (NaCl (۱ g/L)، ($NaNO_3$ (۱ g/L)، (Yeast extract (۱/۵ g/L)، تهیه و مقدار ۱۳/۳ گرم در لیتر (۲۵ درصد) گلوکز پس از فیلتراسیون به‌عنوان منبع کربنی و القاءکننده تولید سورفکتین توسط باکتری به محیط کشت پایه اضافه شد. هم‌چنین محلول ۱۰ درصد جرمی $(NH_4)_2SO_4$، محلول ۲/۵ درصد جرمی $MgSO_4$ و محلول حاوی عناصر کم مقدار شامل (۰/۵ g/lit) EDTA، (۳ g/L) $Mn.SO_4H_2O$، (۰/۱ g/L) $CaCl_2.2H_2O$، (۰/۱ g/L) $ZnSO_4.7H_2O$، (۰/۱ g/L) $FeSO_4.7H_2O$ و (۰/۰۱ g/L) $CuSO_4.5H_2O$ افزوده شد. یک میلی‌لیتر از پیش کشت باکتری به محیط کشت کامل MSSO افزوده شد و در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد و به مدت ٤۸ ساعت در شیکر انکوباتور نگهداری شد. پس از انکوباسیون، سلول باکتری‌ها به‌وسیله سانتریفیوژ با ۹۰۰۰ دور در دقیقه و مدت زمان ۱۵ دقیقه خارج شده و PH محلول فرآورده‌های حاصل با HCl روی ۲ تنظیم شد، سپس به مدت یک شب در دمای چهار درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا بیوسورفکتانت تشکیل رسوب دهد. رسوب حاصل با سانتریفیوژ با ۹۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۲۰ دقیقه جدا شده و با NaOH به pH هفت رسانده شد. محلول به‌دست آمده در فریز درایر خشک شد. پودر حاصل به میزان ۰/۱ درصد در آب حل شد و برای انجام آزمون ارزیابی ماده موثره سورفکتین مورد استفاده قرار گرفت.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.3.6.0]

به‌منظور ارزیابی فعالیت بیوسورفاکتنت تولید شده توسط *B. subtilis MJ01* ، آزمون قطره روغن روی سطح آب انجام گرفت. برای این آزمایش، ۳۰ میلی‌لیتر آب‌مقطر دوبار استریل درپتری دیش (با قطر ۹۰ میلی‌متر) ریخته شد. سپس ۲۰ میکرولیتر روغن خام فیلتر شده (۰/٤٥ µm) استریل به دقت روی سطح آب داخل پتری دیش ریخته شد. ۱۰ میکرولیتر از عصاره استخراج شده از باکتری *B. subtilis* نژاد MJ01 در مرکز و روی سطح نفت خام قرار گرفت. محیط هاله کنار زده شده نفت خام توسط عصاره مشاهده و قطر آن اندازه‌گیری شد. قطر این هاله با فعالیت سورفکتنت همبستگی دارد.

در آزمون همولیز بلاد آگار به‌منظور بررسی توانایی همولیز باکتری و جهت کنترل و مقایسه توانایی همولیز *B. subtilis* MJ01 از دو گونه *Bacillus cereus* و *B. subtilis* استفاده شد. توانایی همولیز بر اساس قطر هاله اطراف کلونی تعریف می‌شود. برای مقایسه از باکتری‌های کلکسیون پژوهشکده بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز استفاده شد.

پس از انجام آزمون قطره روغن و همولیز بلاد آگار مشخص شد باکتری *B. subtilis* نژاد MJ01 پتانسیل تولید سورفکتین را دارد. لذا آزمایش بعدی بر اساس اثر سورفکتین روی سایر میکروب ها مورد بررسی قرار گرفت. جهت ارزیابی خاصیت ضد میکروبی *B. subtilis* MJ01 و لیپوپپتیدهای غیرریبوزومی تولید شده توسط این باکتری، فعالیت آن علیه باکتری *Escherichia coli* و *staphylococcus euros* و هم‌چنین قارچ میله‌ای *Fusarium* sp. (تهیه شده از کلکسیون پژوهشکده بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز) ارزیابی شد.

با توجه به نتایج به‌دست آمده در آزمون‌های قبلی جهت تایید ساختار و ترکیب شیمیایی نمونه بیوسورفکتانت تولید شده توسط *B. subtilis* MJ01 از طیف‌سنجی مادون قرمز (FTIR)، با دستگاه PerkinElmer Spectrum 100، استفاده شد. در این آزمون، یک میلی‌گرم از بیوسورفکتانت جداسازی شده را با ۱۰۰ میلی‌گرم از KBr مخلوط و پس از تبدیل به قرص به مدت ۳۰ ثانیه تحت فشار طیف‌های خروجی در دستگاه برای بیوسورفکتانت استخراجی رویت شد. اسکن IR در دامنه طول موج ٤۰۰ cm^{-1} تا ٤۰۰۰ و با وضوح ۲ cm^{-1} انجام گرفت.

تجزیه فیلوژنی با استفاده از مقایسه توالی 16SrRNA به‌دست آمده از تفسیر ژنوم *B. subtilis* MJ01 انجام شد. برای این منظور از نرم‌افزار Mega نسخه ۷ استفاده شد (Tamura, Stecher, Peterson, Filipski, and Kumar, 2013). هم‌چنین ژنوم *B. subtilis* MJ01 برای تعیین یکسانی تاکسنومیک در لوسای ژنتیکی هفت ژن خانه‌دار (*ilv*d، *pta*، *glp*F، *pur*H، *pyc*A، *tpi*A و *rpo*D) و با استفاده از نگرش تایپینگ توالی چند لوکوسی (MLST) در ابزار آنلاین pubMLST به آدرس اینترنتی http://pubmlst.org/ وارد شد. بهترین توالی ژنومی نزدیک به توالی ژن‌ها توسط نگرش MLST از ژنوم‌های موجود در پایگاه داده به‌دست آمد (Jolley and Maiden 2010).

به‌علاوه، جهت بررسی میزان خویشاوندی و قرابت ژنتیکی از ابزار آنلاین ANI و شاخص همبستگی چهار نوکلئوتیدی به آدرس (http://jspecies.ribohost. com/jspeciesw) وارد شد (Richter, Rosselló-Móra, Oliver Glöckner, and Peplies, 2016) در این مطالعه ژنوم *B. subtilis* MJ01 با استفاده از روش تجزیه فیلوژنی 16SrRNA و روش‌های مقایسه ژنومی برای به‌دست آوردن اطلاعات لازم جهت تجزیه خویشاوندان نزدیک در بین ژنوم‌های توالی‌یابی شده از *B. subtilis* مورد ارزیابی قرار گرفت. برای این ارزیابی ابتدا دانلود ٤۷ ژنوم کاملا توالی‌یابی شده از پایگاه داده NCBI انجام گرفت و پس ازمقایسه اولیه از بین آن‌ها تعداد ۱۰ نژاد برای ارزیابی ANIb انتخاب شد. همچنین در همه ارزیابی‌ها از ژنوم نژاد ۱٦۸ به‌عنوان ژنوم مرجع در باکتری‌های *B. subtilis* استفاده شد.

بر اساس تجزیه‌های فیلوژنی بر پایه مقایسه توالی 16SrRNA، پروفایل ژن‌های هفت گانه MLST و چهار ژنوم با درصد بالای مشابهت در تجزیه ANI، ژنوم‌های خویشاوند نزدیک *B. subtilis* MJ01 برای تجزیه و مقایسه توالی ژن‌های بیوسنتزکننده سورفکتین انتخاب شدند. این ژنوم‌ها از پایگاه داده NCBI دانلود و برای مقایسه اپران سورفکتین مورد استفاده قرار گرفتند. جهت شناسایی، پیش‌بینی و تفسیر اپران سورفکتین ژنوم *B. subtilis* MJ01 وارد ابزار AntiSMASH نسخه ۵/۰/۳ (Antibiotic and secondary metabolite analysis SHell) شد (Weber et al. 2015).

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.3.6.0]

نتایج

پس از استخراج بیوسورفکتانت تولید شده توسط نژاد MJ01 مقدار ۱۰ میکرولیتر از این ماده روی سطح پتری دیش حاوی آب با پوشش نفت به قطر تقریباً دو سانتی‌متر به کنار زده شد. این آزمایش نشان می‌دهد که سورفکتین تولیدی *B. subtilis* MJ01 دارای خاصیت پراکنش قطره نفت و ساختار آمفی پاتیک می‌باشد. قطر ناحیه کنارزده شده روی سطح نفت با غلظت بیوسورفکتنت مرتبط می‌باشد و به‌عنوان شاخصی برای انتخاب باکتری‌های تولید کننده بیوسورفکتانت مورد استفاده قرار می‌گیرد (Bezza and Chirwa 2015). نژاد MJ01 فعالیت آنتی باکتریایی بسیار کمی از خود در مقابل باکتری‌های تحت آزمایش نشان داد. عصاره سورفکتین استخراجی جداسازی شده از این باکتری نیز خاصیت آنتی باکتریایی نشان نداد. باکتری نژاد MJ01 نیز فعالیت بازدارنده در خصوص رشد قارچ *Fusarium* sp. نداشت (شکل ۲). نتیجه این آزمایش‌ها نشان داد که علی‌رغم تولید و جداسازی لیپوپروتئین سورفکتین از *B. subtilis* MJ01، برخلاف سایر باکتری‌های خویشاوند *B. subtilis*، فاقد فعالیت‌های ضدمیکروبی و یا همولیزی می‌باشد (شکل ۱). این تجزیه‌های فنوتیپی داده‌های به‌دست آمده توسط Jahanbani et al. (2015) را در خصوص تفاوت در ساختار سورفکتین تولیدی توسط *B. subtilis* MJ01 تایید می‌کند. در این راستا، جهت تایید و درک بهتر از ساختمان شیمیایی سورفکتین تولیدی مورد ارزیابی طیف سنجی مادون قرمز قرار گرفت.

طیف سنجی FTIR بیوسورفاکتانت جداسازی شده از باکتری نژاد MJ01 (شکل ۳) نشان داد که باند جذبی قوی در cm-1 ۳۴۳۵ ناشی از حضور پیوند N-H و وجود ترکیبات پپتیدی است. هم‌چنین طیف جذبی در cm-1 ۱۵۰۰ تا ۱۶۵۳ دلیلی برای وجود ناحیه پیوند آمیدی CO-N تایید کننده پیوند پپتیدی است. حضور یک زنجیره آلیفاتیک با رویت طیف cm-1 ۲۹۳۷ ، ۲۸۶۵ و ۱۳۸۶ ناشی از پیوند C-H مورد تایید قرار گرفت. الگوی طیف سنجی IR ناشی از حضور ترکیبات پپتیدی و زنجیره آلیفاتیک کربنی نشان دهنده ماهیت لیپوپپتیدی ترکیب جداسازی شده است. مقایسه این الگو با الگوی استاندارد بدست آمده از سورفکتین تجاری شرکت Sigma-Alderich منتشر شده در مقالات (Bezza and Chirwa 2015) و حضور گروه‌های کارکردی شامل آمید، پیوند پپتیدی و ناحیه آلیفاتیک ماهیت سورفکتین تولید شده توسط *B. subtilis* MJ01 را تایید می‌کند. تفاوت در داده‌های به‌دست آمده از تجزیه‌های فنوتیپی و طیف‌سنجی مادون قرمز این فرضیه را که امکان دارد این باکتری در مسیر اپران کد کننده لیپوپپتیدهای غیرریبوزومی خود دارای تفاوت‌هایی است که نیاز به بررسی در سطح ژن، پروتئین و مسیر متابولیکی خواهد داشت را تقویت نمود. از این رو جهت مقایسه اپران بیوسنتز کننده این باکتری با سایر نژادهای خویشاوند نسبت به تعیین رابطه خویشاوندی با سایر نژادهای *B. subtilis* با روش‌های تلفیقی و سپس مقایسه توالی نوکلئوتیدی اپران سورفکتین و نواحی حفاظت شده اطراف آن اقدام شد.

بر اساس ژنوم تفسیر شده در پلت فرم MicroScope ده اپران rRNA در ساختار ژنوم *B. subtilis* MJ01 شناسایی شد. هر اپران rRNA دارای ساختار ژنی *16S*، *23S* و *5S* هستند. ده توالی 16SrRNA جداسازی و در مرحله اول با یکدیگر مقایسه شدند. طول 16SrRNAهای جداسازی شده ۱۵۳۸ نوکلئوتید می‌باشد. هم‌ردیفی این توالی‌ها نشان داد که یک توالی دارای جایگزینی T به جای C در نوکلئوتید شماره ۱۷۲ (از ابتدای توالی) و یک توالی دیگر دارای جایگزینی در نوکلئوتید شماره ٤٧٢ (G جایگزین T) است. از این رو از توالی توافقی برای تجزیه فیلوژنی از طریق نرم‌افزار Mega نسخه ۷ به‌کار برده شدند (شکل ٤).

تجزیه بلاست توالی 16SrRNA نشان داد که باکتری نژاد MJ01 یکسانی ۱۰۰ درصدی با 16SrRNA باکتری نژاد *B. subtilis* strain AER314-2 و هم‌چنین *Bacillus* sp. JS، *B. subtilis* subsp. spizizenii TU-B-10 و 16SrRNA باکتری *B. subtilis* strain BS3902 دارد.

هم‌چنین تجزیه فیلوژنی با استفاده از داده‌های به‌دست آمده از تجزیه هفت ژن MLST نشان داد که ارتباط بالایی بین نژاد MJ01 و نژادهای *B. subtilis* spizizenii BGSC3A17 وجود دارد.

تجزیه ژن‌های هفت‌گانه در پایگاه داده pubMLST نشان می‌دهد که سه توالی ژنی *ivl*D:19، *pta*: 8 و *rpo*D: 5 با توالی‌های موجود در پایگاه داده مشابهت دارند. ولی در ژنوم *B. subtilis* MJ01

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.3.6.0]

موتانت‌های جدیدی از لوکوس‌های ژنی *glp*F، *pur*H و *pyc*A را نشان می‌دهد. این تجزیه هم‌چنین مشخص نمود توالی ژن *tpi* در ژنوم MJ01 نسبت به نسخه موجود در پایگاه داده کاملا وارونه شده‌است (جدول ۱). این تجزیه نشان می‌دهد که ژنوم *B. subtilis* MJ01 دارای جهش ژنی متعددی است که توالی‌های کد کننده آن با پایگاه داده pubMLST متفاوت است.

مقایسه میانگین یکسانی نوکلئوتید (ANI) با استفاده از JSpeciecsWS نیز نشان داد که باکتری نژاد MJ01 مشابهت بالایی با باکتری *B. subtilis* subsp. spizizenii TU-B-10 دارد (جدول۲).

جدول ۱- نتیجه تجزیه تایپینگ توالی چندلوکوسی (MLST) هفت ژن خانه‌دار مهم در گروه *B. subtilis* و جستجوی آن‌ها در ژنوم MJ01 با استفاده از ابزار آنلاین pubMLST

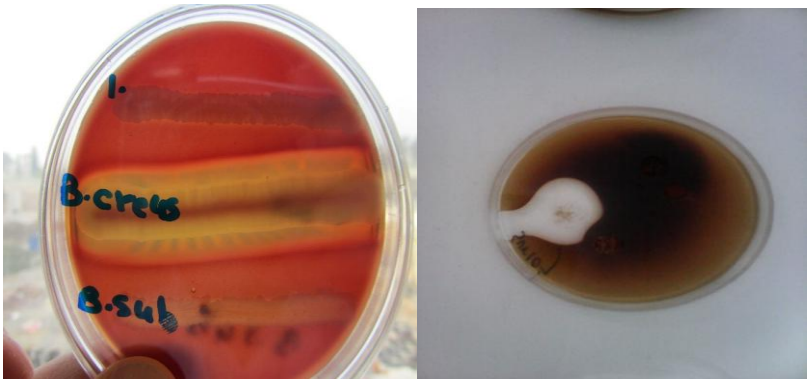
شروع موقعیت در ژنوم MJ01	تفاوت	طول	نزدیک‌ترین مشابهت آللی	بهترین پروفایل جورشده
۲۰۷٤٥۲٥	^{147}A-------^{2074671}G	۳۸٤	*glp*F: 19	*Bacillus subtilis* spizizenii BGSC3A17
۱۷۸۱۹٦۸	^{114}G-------^{1782081}A ^{255}A-------^{1782222}G ^{326}C-------^{1782293}T	۳۹۹	*pur*H: 25	*Bacillus subtilis* spizizenii BGSC3A17
۲٦۱۹٦۷۳	^{48}A-------^{2619720}C ^{126}G-------^{2619798}A ^{324}T------^{2619996}C	۳۹۹	*pyc*A: 21	*Bacillus subtilis* spizizenii BGSC3A17
۳۰۹۰۸۰-۳۰۸٦٦۰	وارونگی کامل	٤۲۰	*tpi*A: 7	*Bacillus subtilis* spizizenii DSM15029,BGSC2A8,NRRL B-23049, TU-B-10

جدول ۲- نتیجه تجزیه ANI – میانگین یکسانی نوکلئوتید برپایه بلاست(ANIb) و برپایه MUMmer (ANIm)

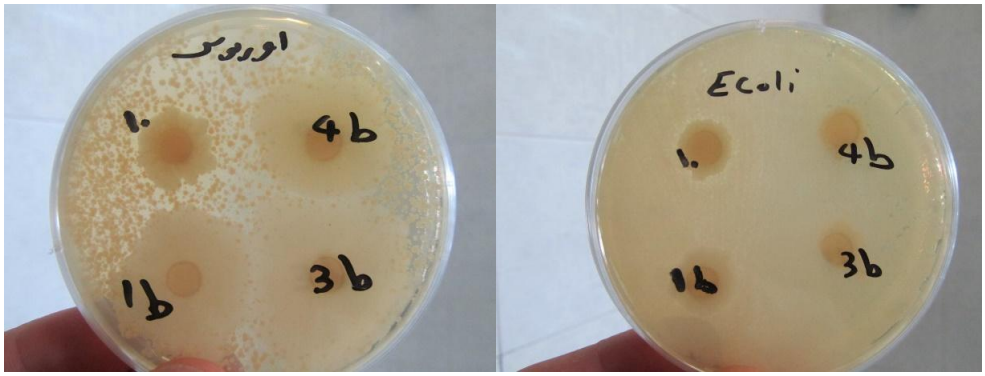
Species Name	Accession Number	Z-score	ANIb	ANIm
Bacillus subtilis spizizenii TU-B-10	NC_016047	0.99963	99.13	99.25
Bacillus subtilis spizizenii NRS 231	NZ_CP010434	0.99946	96.52	96.74
Bacillus subtilis spizizenii W23	NC_014479	0.99946	96.52	96.73
Bacillus subtilis T30	CP011051	0.9994	96.52	96.73
Bacillus subtilis UD1022	CP011534	0.9989	92.97	93.27
Bacillus subtilis HJ5	NZ_CP007173	0.99893	92.96	93.26
Bacillus subtilis BSD-*2*	NZ_CP013654	0.99892	92.96	93.28
Bacillus subtilis BAB-1	NC_020832	0.99893	92.95	93.23
Bacillus subtilis BSP1	NC_019896	0.99886	92.93	93.25
Bacillus subtilis RO-NN-1	NC_017195	0.99877	92.92	93.28
Bacillus subtilis XF-1	NC_020244	0.99874	92.9	93.23
Bacillus subtilis 168	NC_000964	0.99864	92.86	93.25

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.3.6.0]



شکل ۱- نتیجه آزمایش همولیز بلاد آگار توسط *Bacillus subtilis* MJ01 و مقایسه آن با باکتری *B.cereus* و *B. subtilis* ، آزمون قطره روغن جهت نشان دادن فعالیت بیوسورفکتنت تولیدی *Bacillus subtilis* MJ01



شکل ۲- بررسی خاصیت آنتاگونیستی *Bacillus subtilis* MJ01 با باکتری‌های *E.coli* و *S. euros*

نتیجه تجزیه همبستگی بین کلیه ژنوم‌های کامل و کانتیگ‌های موجود در پایگاه داده توسط این ابزار نشان داد همبستگی تترا برای این باکتری بعد از مقدار – Z ۰/۹۹۹۶۳ برای نژاد spizizenii TU-B-10، به کانتیگ باکتری از خانواده Planococcaceae به‌نام *Jeotglibacillus marinus* DSM 1297 با مقدار Z، ۰/۹۹۹۵۹ می‌رسد. سومین نژاد باکتری که بیش‌ترین مقدار Z را دارد، و کانتیگ باکتری *B. subtilis* JRS7 با مقدار عدد Z ۰/۹۹۹۵ بود. در حالیکه بیش‌ترین میزان یکسانی نوکلئوتید ژنوم *B. subtilis* MJ01 در ژنوم‌های کامل توالی‌یابی شده با نژادهای گروه spizizenii دیده می‌شود. این نتایج با تجزیه مقایسه مقدار هیبریداسیون DNA-DNA دیجیتال برای ژنوم *B. subtilis* MJ01 که قبلاً برای این ژنوم انجام گرفته است مشابهت دارد (داده‌ها منتشر نشده‌است). پس از پیش‌بینی متابولیت‌های ثانویه ژنوم *B. subtilis* MJ01 توسط ابزار آنلاین AntiSMASH نسخه ۳/۰/۵ توالی مورد نظر روی ژنوم موقعیت‌یابی شد. این اپران در موقعیت ۱٤۸٤۱۹٤ تا ۱٤٥۸۸۰٤ روی ژنوم MJ01 قرار دارد و برای تجزیه ناحیه مجاور آن نیز از موقعیت ۱٤٥۲٦٦۸ تا ۱٤۹٥۲۰۸ جداسازی شد. نتیجه مقایسه توالی اپران سورفکتین در ابزار آنلاین AntiSMASH نشان داد که توالی اپران سورفکتین *B. subtilis* MJ01 از نظر توالی ژنی با باکتری *B. subtilis* subsp. spizizenii ATCC 6333 و نژاد W23 ۹۷ درصد مشابهت دارد. این اپران از نظر توالی با خویشاوند نزدیک *B. subtilis* MJ01، *B. subtilis* subsp. spizizenii TU-B-10 تنها ۷۸ درصد و با ژنوم مرجع نژاد ۱٦۸ در حدود ۹۱ درصد مشابهت نشان می‌دهد.

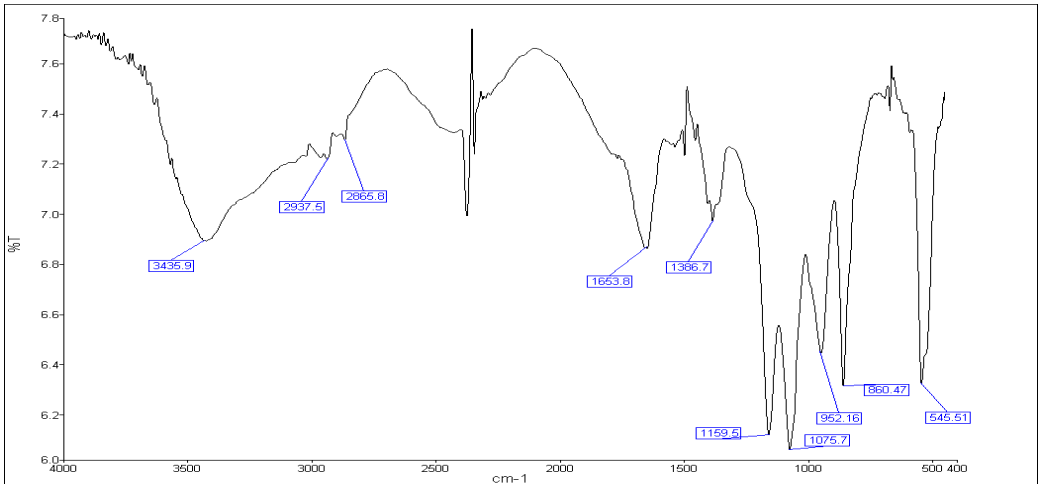
جهت بررسی دقیق‌تر و با توجه به نتایج تجزیه‌های قبلی و شناسایی نژادهای خویشاوند *B. subtilis* نسبت به تعیین محل اپران سورفکتین روی ژنوم این نژادها و جداسازی آن‌ها اقدام شد. مقایسه نواحی کدکننده اپران سورفکتین روی ژنوم‌های خویشاوند نزدیک بر اساس ژنوم‌های موجود در جدول ۲ حاصل از تجزیه ANIb انجام گرفت. این مقایسه هم از نظر توالی‌های کدکننده کناری ژن‌های بیوسنتز کننده و هم از نظر هم‌ردیفی توالی صورت گرفت. مقایسه نواحی کدکننده کناری در دو طرف اپران

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.3.6.0]

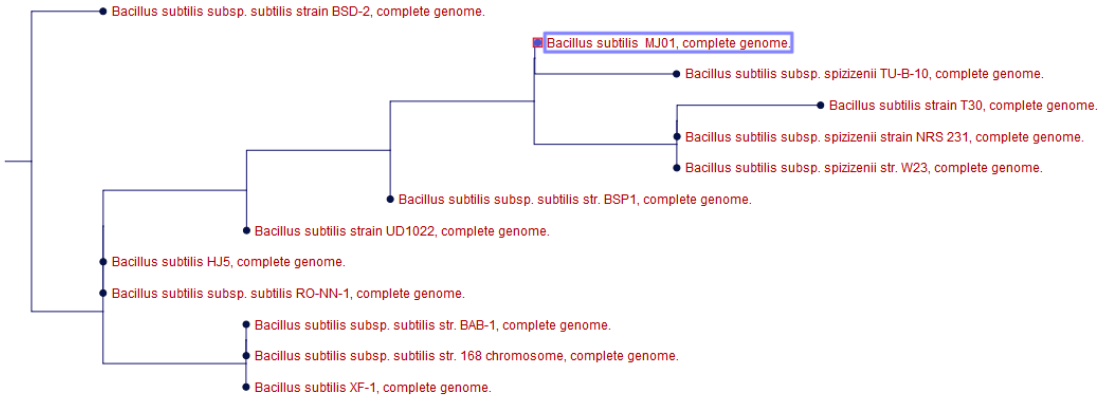
سورفکتین نشان می‌دهد که از نظر ژن‌های کناری بسیار شبیه به باکتری نژاد TU-B-10 است، هر چند تقریباً ژن‌های پیش‌بینی شده در نواحی اطراف اپران سورفکتین در بین نژادهای خویشاوند *B. subtilis* MJ01 نیز وجود دارند. به‌نظر می رسد این بخش از نظر توالی‌های کدکننده کارکردی در نژادهای باکتری های *B. subtilis* حفاظت شده باشد.

مقایسه هم‌ردیفی این ناحیه از ژنوم *B. subtilis* MJ01 با سایر نژادهای باکتری مورد مقایسه دیگر نیز نشان می‌دهد که در بخش کناری به سمت ′۵ (بالادست) از اپران سورفکتین در ژنوم این باکتری یک قطعه حدود ۵۸۸ جفت‌بازی از ژن aryl-phospho-beta-d-glucosidaese حذف شده‌است و طول این ژن (۸۶۱ نوکلئوتید) نسبت به سایر نژادهای *B. subtilis* (۱۴۳۱ نوکلئوتید) کوتاه‌تر شده‌است. این حذف شدگی در ژن گلوکوزیداز در بخش میانی ژن رخ داده است و بخش‌های آغازین و انتهایی ژن با نسخه موجود در باکتری‌های خویشاوند MJ01 دارای یکسانی نوکلئوتیدی در هم‌ردیفی است، به‌طوری‌که به صورت ژن کاذب و قسمتی از یک ژن تفسیر شده‌است.

هم‌چنین در ناحیه انتهایی ′۳ (پایین دست) اپران سورفکتین، توالی به‌طول ۱۰۵۶ جفت‌باز کدکننده پروتئین بدون کارکرد مشخص در ژنوم *B. subtilis* MJ01 و TU-B-10 وجود دارد که در سایر نژادهای باکتری *B. subtilis* وجود ندارد. تجزیه فیلوژنی بین باکتری‌های خویشاوند با نژاد MJ01 نشان می‌دهد که این باکتری از نظر اپران بیوسنتز کننده سورفکتین و نواحی اطراف آن در گروه ژنوم‌های نژاد spizizenii قرار می‌گیرد (شکل ۵).



شکل ۳- طیف‌سنجی مادون قرمز (FTIR) بیوسورفکتنت تولید شده توسط *Bacillus subtilis* MJ01 نشان داد که ماهیت این ماده با سورفکتین تجاری بسیار مشابه می‌باشد.



شکل ٤- رسم فیلوژنی بر اساس توالی 16SrRNA در *Bacillus subtilis* MJ01 و نژادهای خویشاوند

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.3.6.0]



شکل ۵- تجزیه فیلوژنی بر اساس توالی اپران سورفکتین و نواحی اطراف آن در نژادهای خویشاوند با *Bacillus subtilis* MJ01

بحث

نتایج آزمون‌های انجام شده فوق روی *B. subtilis* MJ01 برای شناسایی برخی خصوصیات این نژاد باکتری نشان داد که باکتری *B. subtilis* نژاد MJ01 قادر به تولید لیپوپپتید سورفکتین است، لیکن علی‌رغم کنش سورفکتین تولید شده روی قطره نفت و هم‌چنین تایید ساختار و ترکیب شیمیایی آن توسط آزمون FTIR و شباهت آن با سورفکتین تجاری، خصوصیات کارکردی دیگر این ماده مانند همولیز بلاد آگار و خاصیت ضد میکروبی آن در مقایسه با نژادهای مورد ارزیابی و در دسترس بسیار اندک است. این نتیجه با مطالعات انجام شده سایر محققان در خصوص سورفکتین تولید شده در نژادهای باکتری *B. subtilis* تفاوت دارد (Liu et al. 2016; Yang, Li, Li, Yu, and Shen 2015).

این تفاوت‌ها در ماهیت کارکردی سورفکتین *B. subtilis* MJ01 نشان داد که ممکن است نحوه تولید این لیپوپپتید غیرریبوزمی در *B. subtilis* MJ01 با سایر خویشاوندان خود در سطح ژنوم و یا تغییرات پس از تولید این ماده متفاوت باشد. برای درک این موضوع اولین قدم بررسی شباهت‌ها و تفاوت‌های ژنومی *B. subtilis* MJ01 با سایر خویشاندان با استفاده از یک نگرش تلفیقی ژنومیکس مقایسه‌ای خواهد بود.

استفاده از مقایسه توالی 16SrRNA برای درک روابط خویشاوندی در بین نژادهای مختلف باکتری‌ها یکی از پرکاربردترین روش‌های تعیین مرزبندی‌های تاکسنومیکی است. در سال‌های اخیر مطالعات نشان داده‌اند که وقتی مشابهت 16SrRNA بیش‌تر از ۹۷ درصد باشد احتمال گروه‌بندی اشتباه بین نژادهای خویشاوند نزدیک وجود خواهد داشت (Adelskov and Patel 2016). بنابراین روش‌های جدید و تلفیقی برای مقایسه ژنومی بین باکتری‌هایی که توالی ژنوم آن‌ها بطور کامل توالی یابی می‌شود، پیشنهاد شده تا به تایید رده بندی‌های تاکسنومیکی کمک نماید. از جمله این روش‌ها محاسبه فاصله بین ژنوم – ژنوم، میانگین یکسانی نوکلئوتیدی وتجزیه توالی‌های چند لوکوسی است (Shaligram et al. 2016).

استفاده از تفسیر ژنوم توالی‌یابی شده و پیش‌بینی ژن‌های بیوسنتز کننده متابولیت‌های ثانویه همانند سورفکتین (۹۷ درصد مشابهت) و مقایسه آن با سایر ژنوم‌های توالی‌یابی شده می‌تواند ماهیت شیمیایی این بیوسورفکتانت که متعلق به خانواده سورفکتین است را تایید نماید. این بررسی نشان داد که علی‌رغم تفاوت‌های موجود در توالی اپران تولیدکننده سورفکتین دومین‌های پیش‌بینی شده توسط ابزار آنلاین AntiSMASH ژن‌های تولیدکننده سورفکتین در *B. subtilis* MJ01 از لحاظ نوکلئوتیدی و دومین‌ها کارکردی آنزیم‌های NRPS تفاوت معنی‌داری با سایر گروه‌های خویشاوند خود ندارد بنابراین این فرض که تفاوت در عملکرد سورفکتین *B. subtilis* MJ01 به فرایندهای پس از تولید از جمله جهش و تغییرات پس از ترجمه ژن‌های درگیر در سنتز سورفکتین (Julkowska et al. 2005) و یا در حین ترشح به خارج از سلول باکتری مرتبط باشد را تقویت می‌نماید و به‌نظر

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.3.6.0]

می‌رسد علت تفاوت در کارکرد سورفکتین تولید و عدم فعالیت آنتاگونیستی این باکتری به دلیل تغییرات پس از تولید این ماده و یا سیستم ترشحی *B. subtilis* MJ01 باشد که نیاز به مطالعات گسترده‌تری خواهد داشت.

حذف بخش‌هایی از ژن‌های اپران سورفکتین و هم‌چنین تغییر در توالی آن در باکتری *B. subtilis* MJ01 نشان‌دهنده تولید واریانت جدیدی از سورفکتین توسط این باکتری است. نتایج سایر مطالعات نشان می‌دهد که ساختار هیبریدی در ژن‌های کدکننده اپران سورفکتین منجر به تولید واریانت‌های سورفکتین می‌شود که روی فعالیت و خصوصیات آن تاثیر می‌گذارد (Roongsawang, Washio, Morikawa, 2011). از طرفی مطالعات Jiang et al. (2016) نشان می‌دهد که تغییر در توالی ژن‌های کد کننده سورفکتین و جهش‌های نقطه‌ای در آن باعث می‌شود که خصوصیات سورفکتین از جمله هیدرولیز بلاد آگار و خصوصیت ضد میکروبی آن تحت تاثیر قرار گیرد و ممکن است علت تغییر در خصوصیات ضدمیکروبی و عدم هیدرولیز بلادآگار در باکتری *B. subtilis* MJ01 تغییرات در توالی ژن‌ها و بروز جهش‌های نقطه‌ای روی آن باشد.

هر چند تجزیه فیلوژنی از روش‌های مختلف نشان داد *B. subtilis* MJ01 در زیرگونه spizizenii قرار می‌گیرد ولی تفاوت‌هایی که این باکتری با زیرگونه TU-B-10 دارد این نظریه را که نژاد MJ01 یک نژاد جدید از این زیر گونه با موتاسیون‌ها و توالی‌های کدکننده خاص و بی‌نظیر در ژنوم خود است را تقویت می‌کند و این نژاد بومی ایران را برای مطالعات ژنومیک در آینده مورد توجه قرار می‌دهد. در این مطالعه علاوه بر استفاده از روش‌های تلفیقی و مختلف جهت شناسایی و مرزبندی تاکسونومیکی *B. subtilis* MJ01 نسبت به ارزیابی سورفکتین تولیدی از نگرش ژنومیک مقایسه‌ای پرداخته شد که به شناسایی ورایانت جدیدی از سورفکتین تولید شده توسط این باکتری به محققان در آینده کمک خواهد کرد.

سپاسگزاری

این تحقیق بخشی از رساله دکتری انجام شده در پژوهشکده بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز است که بابت تامین هزینه‌های آن از مسئولین دانشگاه تشکر و قدردانی می‌شود. هم‌چنین از آقای معین جهانبانی و همکاران ایشان در دانشگاه صنعتی شریف با توجه به در اختیار قرار دادن باکتری *B. subtilis* نژاد MJ01 جهت توالی‌یابی و تجزیه‌های بعدی سپاسگزاری می‌نماییم.

منابع

Adelskov J, Patel BKC (2016) A molecular phylogenetic framework for *Bacillus subtilis* using genome sequences and its application to *Bacillus subtilis* subspecies stecoris strain D7XPN1, an isolate from a commercial food-waste degrading bioreactor. 3 Biotech 6: 96.

Ali A, Soares SC, Barbosa E, Santos AR, Barh D, Bakhtiar SM, Hassan SS, Ussery DW, Silva A, Miyoshi A and Azevedo V (2013) Microbial Comparative Genomics: An Overview of Tools and Insights Into The Genus Corynebacterium. Journal of Bacteriology and Parasitology 4: 1-16.

Bezza FA, Chirwa EMN. (2015) Production and applications of lipopeptide biosurfactant for bioremediation and oil recovery by *Bacillus subtilis* CN2. Biochemical Engineering Journal 101: 168-178.

Bisch G, Ogier JC, Médigue C, Rouy Z, Vincent S, Tailliez P, Givaudan A and Gaudriault S (2016) Comparative Genomics between Two Xenorhabdus bovienii Strains Highlights Differential Evolutionary Scenarios within an Entomopathogenic Bacterial Species. Genome Biology and Evolution 8: 148-160.

Jahanbani Vashareh Moein (2015) Microorganisms Effects on Interfacial Tension and Wettability during Smart Water Injection in Oil Reservoirs,Sharif Universtiy of Technology, Iran. (In Farsi).

Jiang J, Gao L, Bie X, Lu Z, Liu H, Zhang C, Lu F and Zhao H. (2016) Identification of novel surfactin derivatives from NRPS modification of Bacillus subtilis and its antifungal activity against Fusarium moniliforme. BMC Microbiology 16: 31.

Jolley KA, Maiden MCJ (2010) BIGSdb: Scalable analysis of bacterial genome variation at the population level. BMC Bioinformatics 11: 595.

Julkowska D, Julkowska D, Obuchowski M, Obuchowski M, Holland IB and Seror SJ (2005) Comparative Analysis of the Development of Swarming Communities of *Bacillus subtilis* 168 and a natural wild type: critical effects of surfactin and the composition of the medium. Journal of Bacteriology 187: 65-76.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.3.6.0]

Land M, Hauser L, Jun SR, Nookaew I, Leuze MR, Ahn TH, Karpinets T, Lund O, Kora G, Wassenaar T, Podel S and Ussery, DW (2015) Insights from 20 years of bacterial genome sequencing. Functional and Integrative Genomics 15: 141-61.

Liu H, Qu X, Gao L, Zhao S, Lu Z, Zhang C, and Bie X (2016) Characterization of a *Bacillus subtilis* surfactin synthetase knockout and antimicrobial activity analysis. Journal of Biotechnology 237: 1-12.

Loman NJ, Pallen MJ (2015) Twenty years of bacterial genome sequencing. Nature Reviews Microbiology 13: 1-9.

Richter M, Rosselló-Móra R, Oliver Glöckner F, Peplies J. (2016) JSpeciesWS: a web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison. Bioinformatics 32: 929-931.

Roongsawang N, Washio K, Morikawa M (2011) Diversity of nonribosomal peptide synthetases involved in the biosynthesis of lipopeptide biosurfactants. International Journal of Molecular Sciences. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI) 12: 141-172.

Shaligram S, Kumbhare SV, Dhotre DP, Muddeshwar M G, Kapley A, Joseph N, Purohit HP, Shouche YS and Pawar S. P. (2016) Genomic and functional features of the biosurfactant producing *Bacillus* sp. AM13. Functional and Integrative Genomics 16: 557-566.

Sharma A, Satyanarayana T (2013) Comparative genomics of *Bacillus* species and its relevance in industrial microbiology. Genomics Insights 6:25-36.

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013) MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution 30: 2725-2729.

Vallenet D, Belda E, Calteau A, Cruveiller S, Engelen S, Lajus A, Médigue C (2013) MicroScope-an integrated microbial resource for the curation and comparative analysis of genomic and metabolic data. Nucleic Acids Research 41: 636-647.

Vallenet D, Engelen S, Mornico D, Cruveiller S, Fleury L, Lajus A, Rouy A, Roche D, Salvignol G, Scarpelli C and Me´digue C. (2009) MicroScope: A platform for microbial genome annotation and comparative genomics. Database 2009, bap021.

Weber T, Blin K, Duddela S, Krug D, Kim HU, Bruccoleri R, Lee SY, Fischbach MA, Müller R, Wohlleben W, Breitling R, Takano E, Medema MH (2015) antiSMASH 3.0-a comprehensive resource for the genome mining of biosynthetic gene clusters. Nucleic Acids Research 43: 237-243.

Yang H, Li X, Li X, Yu H, Shen Z (2015) Identification of lipopeptide isoforms by MALDI-TOF-MS/MS based on the simultaneous purification of iturin, fengycin, and surfactin by RP-HPLC. Analytical and Bioanalytical Chemistry 407: 2529-2542.

Zwick ME, Joseph SJ, Didelot X, Chen PE, Bishop-Lilly KA, Stewart AC, Willner K, Nolan N, Lentz Sh, Thomason M, Sozhamannan Sh, Mateczun AJ, Read TD, Du L, (2012) Genomic characterization of the *Bacillus cereus* sensu lato species: Backdrop to the evolution of Bacillus anthracis. Genome Research 22: 1512-1524.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.3.6.0]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.3.6.0] [Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]