

Bacillus cereus group 세균의 genome 정보의 이해

Understanding of Genomic Information of *Bacillus cereus* Group Bacteria

이진성^{1,2*}, 김근성³, 홍수영⁴, 권무식²
Jin-Sung Lee^{1,2*}, Keun-Sung Kim³, Su-Young Hong⁴, Moosik Kwon²

¹(주)나래바이오테크 부설 미생물소재연구소, ²성균관대학교 유전공학과, ³중앙대학교 식품공학과, ⁴한국시험분석연구원
¹Research Institute of NaraeBiotech, Inc., ²Dept. of Genetic Engineering, SungKyunKwan Univ.,
³Dept. of Food Science and Technology, Chung-Ang Univ., ⁴Korea Analysis Research Institute

서론

Bacillus 속에는 약 100여 종의 호기성 또는 통성 혐기성의 포자를 생성하는 그람 양성균의 간균들이 포함되어 있다. 대부분의 경우 *Bacillus* 속 세균들은 토양이나 주변의 환경에서 흔히 존재하며 대다수가 비병원성이다. 하지만 현재 식중독의 원인균인 *B. cereus*, 곤충에게 살충능을 갖는 *B. thuringiensis*, 인간에게 탄저병을 일으켜 생물무기로도 활용되는 *B. anthracis*를 비롯해서 *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. weihenstephanensis* 등 6종의 균주들은 형태학적, 유전학적, 생화학적 특성들이 기타의 다른 종간에서 보여 지는 분류학적 특성보다 더 높은 근연관계를 지니고 있어 *B. cereus* group으로 통칭하고 있다. 특히 이 중에서 *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*는 상당히 높은 유전적인 근연성(genetic relationship)으로 인해서 '*B. cereus sensu lato*' 라고 하는 하나의 새로운 종으로 분류되어야 한다고 제안되기도 한다. 따라서 지난 수십 년간에 걸쳐서 이들 세균을 정확히

동정하고 검출하기 위해서 pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), amplified fragment length polymorphisms (AFLP), multi-locus enzyme electrophoresis (MLEE) 및 multi-locus sequence typing (MLST)과 같은 다양한 방법들이 개발되어 적용되었으나 상술한 바와 같이 이들 세균이 갖는 고도의 근연성으로 인한 종 특이적인 분자 마커의 발굴이 선행되지 못해 *B. cereus* group 세균을 동정하는 데에 어려움이 있다. 따라서 본고는 현재까지 보고된 *B. cereus* group 세균의 genome 정보를 통해서 이들 세균이 갖는 주요 genome 특성을 소개하여 이를 통해 *B. cereus* group의 분자 동정과 관련한 연구에 도움을 주고자 한다.

현재의 생물 genome 정보

현재 NCBI (National Center for Biotechnology Information)의 genome database에 등록된 완전 유전체 염기서열(complete genome sequence) 혹은 부분 유

*Corresponding author : Jin-Sung Lee

62154, Life Science and Technology Bldg., SungKyunKwan Univ., 300, Cheoncheon-dong, Jangan-gu, Suwon-si, Gyeonggi-do, Korea, 440-746
Tel: +88-31-299-4852 Fax: +88-31-299-4853
E-mail: lejis@daum.net

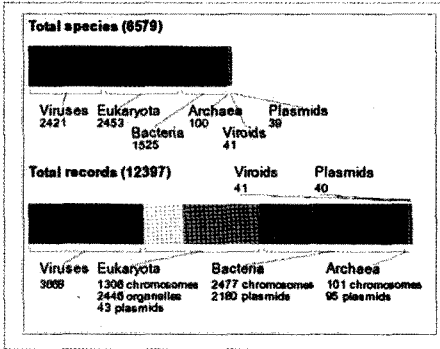


Fig. 1. NCBI genome database에 등록된 genome 해석이 완료되거나 현재 해석중인 생물종의 분류학적 비교(출처 : NCBI genome database, www.ncbi.nlm.gov/sites/genome).

1,525종 등 전체적으로 6,579 종류의 생물종에 관한 genome 정보의 활용이 가능하다. 특히 이 중에서 박테리아는 약 2,477개의 chromosome과 2,180개의 박테리아 유래의 plasmid에 관한 전체 염기서열 정보가 공개되고 있으며 바이러스의 경우는 약 3,668개의 genome이 해석되었다(Fig. 1).

전체 염기서열 (partial genome sequence)이 결정된 genome으로는 바이러스가 2,421종, 진핵생물이 2,453종, 박테리아가

B. cereus group 세균의 genome 해석 현황

NCBI의 genome database에서 genome 해석이 종료된 *Bacillus*속 세균으로는 *B. amyloliquefaciens* 1종, *B. anthracis* 5종, *B. cereus* 10종, *B. clausii* 1종, *B. cytotoxicus* 1종, *B. halodurans* 1종, *B. licheniformis* 2종, *B. megaterium* 2종, *B. pseudofirmus* 1종, *B. pumilus* 1종, *B. selenitireducens* 1종, *B. subtilis* 2종, *B. thuringiensis* 3종, *B. tusciae* 1종, *B. weihenstephanensis* 1종 등 총 15종의 세균에서 33종의 genome 정보가 공개되고 있다. 이 중에서 *B. mycoides*와 *B. pseudomycoides*를 제외한 4종의 *B. cereus* group 세균의 genome 정보를 얻을 수 있다. 특히 이들 *B. cereus* group 세균 중에서 *B. cereus*의 genome은 10종으로 가장 많이 해석되었으며 다음으로 *B. anthracis*가 5종, *B. thuringiensis*가 3종, *B.*

Table 1. *B. cereus* group 세균의 genome의 크기와 특성

| Organism | Genome size (megabase) | GC ratio (%) | No. of chromosome | No. of plasmid |
|--|------------------------|--------------|-------------------|----------------|
| <i>B. anthracis</i> str. 'Ames Ancestor' | 5.47 | 35.2 | 1 | 2 |
| <i>B. anthracis</i> str. A0248 | 5.47 | 35.2 | 1 | 2 |
| <i>B. anthracis</i> str. Ames | 5.2 | 35.4 | 1 | - |
| <i>B. anthracis</i> str. CDC 684 | 5.47 | 35.2 | 1 | 2 |
| <i>B. anthracis</i> str. Sterne | 5.2 | 35.4 | 1 | - |
| <i>B. cereus</i> 03BB102 | 5.48 | 35.3 | 1 | 1 |
| <i>B. cereus</i> AH187 | 5.63 | 35.5 | 1 | 4 |
| <i>B. cereus</i> AH820 | 5.58 | 35.3 | 1 | 3 |
| <i>B. cereus</i> ATCC 10987 | 5.41 | 35.5 | 1 | 1 |
| <i>B. cereus</i> ATCC 14579 | 5.42 | 35.3 | 1 | 1 |
| <i>B. cereus</i> B4264 | 5.4 | 35.3 | 1 | - |
| <i>B. cereus</i> E33L | 5.85 | 35.1 | 1 | 5 |
| <i>B. cereus</i> G9842 | 5.75 | 35.0 | 1 | 2 |
| <i>B. cereus</i> Q1 | 5.49 | 35.5 | 1 | 2 |
| <i>B. cereus</i> biovar <i>anthracis</i> str. CI | 5.49 | DNF* | DNF* | DNF* |
| <i>B. thuringiensis</i> BMB171 | 5.92 | DNF* | DNF* | DNF* |
| <i>B. thuringiensis</i> serovar konkukian str. 97-27 | 5.28 | 35.4 | 1 | 1 |
| <i>B. thuringiensis</i> str. Al Hakam | 5.36 | 35.4 | 1 | 1 |
| <i>B. weihenstephanensis</i> KBAB4 | 5.91 | 35.5 | 1 | 4 |

*Data not found

(출처 : NCBI genome database, www.ncbi.nlm.gov/sites/genome)

*weihenstephanensis*가 1종 해석되어 genome 정보가 공개되고 있는 것으로 나타났다. Table 1에서처럼 *B. cereus* group 세균의 genome의 크기를 보면 작게는 5.2에서 크게는 5.92 megabase 정도로 해석되었으며 이들은 한 개의 chromosome에 packaging되어 있는 것으로 보여진다. 그러나 genome의 크기는 종간에서의 변이가 심하여 종을 특징짓는 기준으로 적절하지 않은 것으로 보여진다. 또한, *B. cereus* group 세균의 GC 함량은 약 35% 정도로 상대적으로 AT 함량이 높고 genome 크기의 변이보다는 GC 함량의 변이가 좀 더 낮음을 알 수 있다. 특히, 이들 *B. cereus* group 세균의 병원성을 부여해 주는 유전자가 위치한 plasmid의 존재 여부와 수는 동일 종간에서도 변이가 심한 것을 알 수 있는데 예를 들면 *B. cereus* AH187는 4개의 plasmid를 보유하고 있는 반면에 *B. cereus* B4264는 전혀 plasmid를 보유하고 있지 않다. 하지만, 전체적으로 볼 때 *B. cereus* group 세균은 적게는 1개, 많게는 5개의 plasmid를 보유하고 있다는 것을 genome 정보를 통해서 알 수 있다.

B. cereus group 세균의 genome 정보

앞에서 상술한 것처럼 현재 *B. cereus*의 genome 정보는 10여개 정도가 보고되고 있다. 이 중에서 David와

Ivanova 등에 의해서 보고된 *B. cereus* ATCC 10987 (nonpathogenic strain)와 *B. cereus* ATCC 14579의 genome 정보를 비교해 보면(Table 2) 염색체상에 위치하고 있는 유전자는 *B. cereus* ATCC 10987이 5,642개로 *B. cereus* ATCC 14579의 5,366개보다 약 300여개 정도가 많으나 오히려 *B. anthracis* Ames보다는 약 140개 정도 밖에 많지 않음을 알 수 있다. Genome 상에서 암호화하고 있는 유전자의 비율도 *B. cereus* ATCC 10987 (85%)보다 *B. anthracis* Ames (84.3%)와 *B. cereus* ATCC 10987 (84%)가 좀 더 유사한 특성을 보였으며 기능이 알려진 유전자도 *B. cereus* ATCC 10987 (2,802개)가 *B. cereus* ATCC 14579 (3,839개)보다 *B. anthracis* Ames (2,762개)와 더 유사함을 알 수 있다. 이처럼 *B. cereus* group에 속하는 3개 균주의 genomic similarity로 볼 때 이들 세균은 분자적으로 상당히 근연관계임을 간접적으로 알 수 있다. 한편, 이들 세균이 갖고 있는 extrachromosome인 plasmid의 특성을 비교해 보면(Table 3) *B. cereus* ATCC 10987은 약 208 kb의 pBc10987이라는 한 개의 plasmid를 보유하고 있으며 *B. cereus* ATCC 14579는 약 15 kb의 pBc1in15라는 한 개의 plasmid를 가지고 있다. 그러나 *B. anthracis* Ames은 181 kb의 lethal toxin이 암호화된 pXO1과 94 kb의 poly-D-glutamic acid capsule이 암호화된 pXO2 plasmid 두 개를 보유하고 있어 이 두 종류의 mega-plasmid

Table 2. *B. cereus*와 *B. anthracis*의 genome 비교

| Feature | <i>B. cereus</i> ATCC 10987 | <i>B. cereus</i> ATCC 14579 | <i>B. anthracis</i> Ames |
|-------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|--------------------------|
| Size(bp) | 5,224,283 | 5,426,909 | 5,227,293 |
| No. of genes | 5,642 | 5,366 | 5,508 |
| Percentage coding | 85 | 84 | 84.3 |
| Average gene length(nt) | 787 | 820 | 800 |
| G+C content(%) | 35.6 | 35.3 | 35.4 |
| rRNA operons | 12 | 13 | 11 |
| tRNAs | 98 | 108 | 95 |
| sRNAs | 3 | 3 | 3 |
| Genes with assigned functions | 2,802 | 3,839 | 2,762 |

출처 : NCBI genome database, www.ncbi.nlm.gov/sites/genome

Table 3. *B. cereus*와 *B. anthracis*의 plasmid 비교

| Feature | <i>B. cereus</i> ATCC 10987 | <i>B. cereus</i> ATCC 14579 | <i>B. anthracis</i> Ames | |
|-------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|--------------------------|--------|
| Name of plasmid | pBc10987 | pBClin15 | pXO1 | pXO2 |
| Size(bp) | 208,369 | 15,100 | 181,677 | 94,829 |
| No. of genes | 242 | 21 | 217 | 113 |
| Percentage coding | 80.9 | 84 | 77.1 | 76.2 |
| Average gene length(nt) | 696 | 820 | 645 | 639 |
| G+C content(%) | 33.5 | 38 | 32.5 | 33 |
| Genes with assigned functions | 94 | 4 | 65 | 38 |

출처 : Nucleic Acid Research, 32, 977-988, 2004

(pXO1과 pXO2) 보유 여부를 이용해서 *B. cereus*와 *B. anthracis*의 구별이 가능해진다. 따라서 많은 논문에서 볼 수 있듯이 *B. anthracis*가 갖고 있는 두 개의 mega-plasmid가 *B. cereus* group의 주요 세균의 감별에 중요한 분자마커로 이용되는 것이다. 하지만 상술한 것과 같이 Table 1에서처럼 *B. anthracis*들 중에서도 이들 두개의 mega-plasmid가 모두 존재하지 않거나 한 개씩만 존재하는 세균들이 있어 이들 mega-plasmid만으로 *B. anthracis*를 특정 하는 것 이외에 보완할 수 있는 다른 마커가 필요하다. 한편, *B. cereus* group 세균이 갖고 있는 plasmid는 동일 종 내에서도 유전자의 수와 크기가 상당히 상이하고 변이가 심한 것으로 보아 plasmid만을 한정해서 *B. cereus* group의 분자 동정을 하는 것은 상당한 무리가 따른다(Table 4). 이처럼 현재의 *B. cereus* group 세균의 genome 정보는 종간, 종내 수준에서 폭넓고 상세한 핵산 비교가 가능하여 과거에 일부 국한된 세균의 유전자 특성을 통

해서 나타나는 상이한 결과가 어떻게 도출되었는지에 대한 정보를 제공해 준다.

B. cereus와 B. anthracis의 표현형 및 병원성 관련 genome 정보

B. cereus group 세균의 genome상에서 표현형적 특성과 병원성을 제공하는 유전자들을 비교해 보면 종간에 특이적인 유전자를 확인할 수 있다. 예를 들면 Table 5에서 볼 수 있듯이 *B. cereus* group 세균 중 *B. anthracis*에서만 유일하게 tripartite lethal gene이 존재함을 알 수 있다. 하지만, *B. thuringiensis* 97-27 genome에서 cry gene이 발견되지 않는 것은 상당히 의외의 결과이다. 왜냐하면 *B. cereus* group에서 *B. thuringiensis*를 구별하는 가장 중요한 마커가 바로 곤충에 대해서는 살충성을 제공하지만 인간에게는 무해한 crystal toxin을 암호화하는

Table 4. *B. cereus* group에 속한 균주가 갖고 있는 plasmid 염기서열의 비교

| Plasmid name | Strain | Size(bp) | G+C(%) | No. of CDS | Functional CDS |
|--------------|--------------|----------|--------|------------|----------------|
| pBc10987 | ATCC 10987 | 208,369 | 33 | 242 | 91 |
| pBClin15 | ATCC 14579 | 15,100 | 38 | 21 | 4 |
| pBCXO1 | G9241 | 191,110 | 33 | 177 | 61 |
| pBC218 | G9241 | 218,094 | 32 | 185 | 116 |
| pZK5 | Zebra killer | 5,108 | 31 | 5 | 2 |
| pZK8 | Zebra killer | 8,191 | 32 | 8 | 4 |
| pZK9 | Zebra killer | 9,150 | 31 | 10 | 5 |
| pZK54 | Zebra killer | 53,501 | 32 | 58 | 27 |
| pZK467 | Zebra killer | 466,370 | 33 | 465 | 228 |

출처 : FEMS Microbiology Reviews, 29, 303-329, 2005

Table 5. *B. cereus* group 세균의 주요 표현형 및 병원성 유전자의 특성

| Characteristic | <i>B. anthracis</i> Ames | <i>B. cereus</i> ATCC10987 | <i>B. cereus</i> ATCC14579 | <i>B. cereus</i> E33L | <i>B. thuringiensis</i> 97-27 |
|---|-----------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------|----------------------------------|
| Tripartite lethal toxin | O | X | X | X | X |
| Urease gene cluster | X | O | X | X | X |
| Xylose utilization genes | X | O | X | X | X |
| Capsule synthesis Polysaccharide capsule | X | O | O | X | O |
| Polyglutamic acid capsule | O | X | X | X | X |
| Fagellar genes | Fragmental | Intact | Intact | Intact | Intact |
| Functional PlcR | X | O | O | O | O |
| Arginine degradation Arginase genes | O | O | O | O | O |
| Arginine deiminase genes | X | O | O | X | O |
| Restriction enzyme | X | O | O | X | Partial |
| Enterotoxins Hemolytic enterotoxin HBL | X | O | X | X | O |
| Nonhemolytic enterotoxin NHE | O | O | O | O | O |
| Diarrheal toxin BceT | X | X | O | X | O |
| cry genes | X | X | X | X | X |

출처 : Journal of Bacteriology, 188, 3382-3390, 2006

cry gene으로서 이들 유전자는 다양한 조합으로 *B. thuringiensis*에서만 존재하기 때문이다. 따라서 미국 FDA의 BAM manual에서도 *B. thuringiensis*를 동정할 때에 cry gene에 의해서 만들어지는 crystal toxin의 존재 여부로 최종 확인하도록 권고하고 있다. 또한, 6종의 *B. cereus* group 세균에서 nonhemolytic enterotoxin NHE 유전자, hemolytic enterotoxin HBL 유전자 및 diarrheal toxin BceT 유전자의 존재 여부가 기존에 보고

된 이들 유전자에 대한 다양한 *B. cereus* group 세균의 연구와 비교해 보면 중간, 혹은 종 내에서 일관성 있게 확인되지 않음을 알 수 있다(Table 5). 즉, 이 유전자들은 *B. cereus* group 세균을 동정하는 데 유용한 유전자가 아님을 genome 비교를 통해서 알 수 있다. 한편, *B. cereus* group 세균에서 발견되는 phosphatidylinositol-specific phospholipase C의 발현 시 positive regulator인 PlcR 유전자는 non-specific virulence gene의 transcriptional activator로서 *B. anthracis*를 제외한 *B. cereus* 및 *B. thuringiensis*에서는 정상적인 기능을 가지고 있다. 이것은 PlcR 유전자에 대한 multiple alignment 분석에서 *B. anthracis*의 PlcR 유전자가 *B. cereus*와 *B. thuringiensis*와는 다르게 3' end 영역에서 truncate되어 있음을 확인할 수 있다(Fig. 2). 실제로 *B. anthracis*의 3' end 영역이 짧은 PlcR 유전자가 이 유전자에 의해서 조절되는 phosphatidylinositol-specific phospholipase C가 정상적인 발현이 되지 못하는 원리를 이용하여 *B. anthracis*를 동정하는

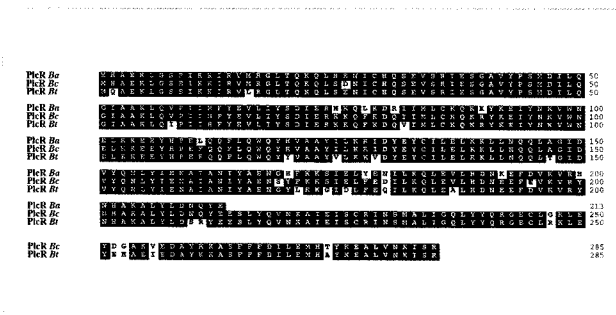


Fig. 2. *B. anthracis*(Ba), *B. cereus*(Bc) 및 *B. thuringiensis*(Bt)의 PlcR 유전자의 아미노산 서열 비교(출처: Mol Microbiol., 32(5), 1043-53, 1999).

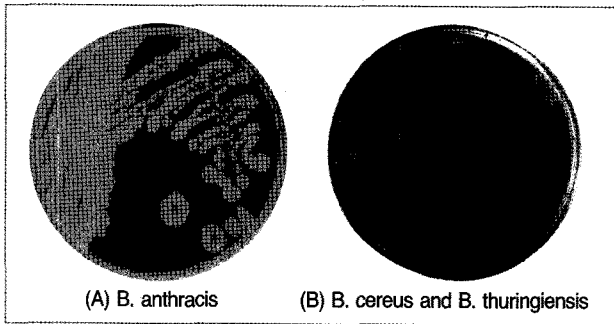


Fig. 3. Anthracis Chromogenic Plating Medium. (A) Cream to pale teal-blue-colored colonies of *B. anthracis* after 20-24 hours at 35-37°C (B) Dark teal-blue colonies of *B. cereus* and *B. thuringiensis* after 20-24 hours at 35-37°C (출처 : R&F Products, www.rf-labs.com).

chromogenic 평판배지가 개발되었다(Fig. 3).

결론

B. cereus group 세균 중에서 *B. cereus*, *B. anthracis* 및 *B. thuringiensis*가 생리적, 생화학적, 유전학적으로 구분이 어려운 것은 이들이 비록 병원성의 정도와 범위에 있어서 상당한 차이가 있음에 불구하고 16S rRNA 및 16S-23S rRNA internal transcribed spacers 영역의 염기서열이 거의 같은 정도로 매우 유사한 genomic core를 공유하고 있기 때문으로 여겨지며 이와 같은 이유로 이 세 가지 세균들을 하나의 종으로 간주해야 한다는 논의가 일어나고 있다. 앞서 기술한 것과 같이 *B. cereus*, *B. anthracis* 및 *B. thuringiensis*는 다른 종간의 세균에서 볼 수 없는 대단히 유사한 genome을 보유하고 있는 것으로 추정되고 있으며 오히려 이들이 갖고 있는 plasmid에서 다양한 변이가 존재하고 있음을 알 수 있다. 이것은 아마도 이들 세균간의 conjugation을 통한 plasmid의 전파 또는 보유한 plasmid의 자연적인 소실 등이 원인이 아닐까 생각된다. 그러므로 이들이 갖고 있는 extrachromosome인 plasmid DNA를 이용한 *B. cereus* group의 분자적 동정은 문제점이 있다. 따라서 genome 정보를 이용한 종 특이적인 분자 마커의 발굴과 활용은 향후 *B. cereus* group의 분자 감별 연구가 지향해야 할 방향이 아닐까 생각한다. f

감사의 글

본 연구는 2010년도 식품의약품안전청 용역연구개발사업(10162식중독056) 및 2008년도 중소기업청 산학협력력 기업부설연구소 설치 지원사업(S6080570310)에 의해서 수행된 것으로 이에 감사드립니다.



참고 문헌

1. Ababti, C., Bhatnagar, N. D., and Bhatnagar, R. : Bacterial Insecticidal toxins. *Critical Rev. Microbiol.*, 30(1), 33-54 (2004)
2. Ahmed, A. H., Moustafa, M. K., and Marth, E. H. : Incidence of *Bacillus cereus* in milk and some milk products. *J. Food Prot.*, 46, 126-128 (1983)
3. Carlson, C., Caugant, D., and Kolsto, A. B. : Genotypic diversity among *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 1719-1725 (1994)
4. Cliff, S. H., Xie G., Challacombe, J. F., Altherr, M. R., Bhotika, S. S., Bruce, D., Campbell, C. S., Campbell, M. L., Chen, J., Chertkov, O., Cleland, C., Dimitrijevic, M., Doggett, N. A., Fawcett, J. J., Glavina, T., Goodwin, L. A., Hill, K. K., Hitchcock, P., PJackson, J., Keim, P., Kewalramani, A. R., Longmire, J., Lucas, S., Malfatti, S., McMurry, K., Meincke, L. J., Misra, M., Moseman, B. L., Mundt, M., Munk, A. C., Okinaka, R. T., Reilly, L. P., Richardson, P., Robinson, D. L., Rubin, E., Saunders, E., Tapia, R., Tesmer, J. G., Thayer, N., Thompson, L. S., Tice, H., Ticknor, L. O., Wills, P. L., Brettin, T. S., and Gilna, P. : Pathogenomic sequence analysis of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolates closely related to *Bacillus anthracis*. *J. Bacteriol.*, 188(9), 3382-3390 (2006)
5. David, A. R., Ravel, J., Okatad, O. A., Helgason, E., Cer, R. Z., Jiang, L., Shores, K. A., Fouts, D. E., Tourasse, N. J., Angiuoli, S. V., Kolonay, J., Nelson, W. C., Kolsto, A. B., Fraser, C. M., and Read, T. D. : The genome sequence of *Bacillus cereus* ATCC 10987 reveals metabolic adaptations and a large plasmid related to *Bacillus anthracis* pXO1. *Nucl. Acids Research*, 32(3), 977-988 (2004)
6. Daffonchio, D., Cherif, A., and Borin, S. : Homoduplex and heteroduplex polymorphisms of the amplified ribosomal 16S-23S internal transcribed spacers describe genetic relationships in the '*Bacillus cereus* group'. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 5460-5468 (2000)
7. David, A. R., Altherr, M. R., Han, C. S., and Ravel, J. : Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms. *FEMS Microbiol. Reviews*, 29, 303-329 (2005)
8. Drobniowski, F. A. : *Bacillus cereus* and related species. *Clin. Microbiol. Rev.*, 6(4), 324-338 (1993)
9. FDA/CFRAN, Bacteriological Analytical Manual Chap. 14.

- Bacillus cereus* (2004)
10. Granum, P. E., and Lund, T. : *Bacillus cereus* enterotoxins. FEMS Microbiol. Lett., 157, 223-228 (1997)
 11. Harrel, L. J., Anderson, G. L., and Wilson, K. H. : Genetic variability of *Bacillus anthracis* and related species. J. Clin. Microbiol., 33, 1847-1850 (2001)
 12. Helgason, E., Okstad, O. A., Caugant, D. A., Johansen, H. A., Fouet, A., Mock, M., Hegna, L., and Kjolsto, A. B. : *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*-one species on the basis of genetic evidence. Appl. Environ. Microbiol., 66, 2627-2630 (2000)
 13. Helgason, E., Caugant, D. A., Olsen, I., and Kolsto, A. B. : Genetic structure of populations of *Bacillus cereus* and *B. thuringiensis* isolates associated of periodontitis and other human infections. J. Clin. Microbiol., 38, 1615-1622 (2000)
 14. Helgason, E., Caugant, D. A., Lecadet, M. M., Chen, Y., Mahillon, J., Lovgren, A., Hegna, L., Kvaloy, K., and Kolsto, A. B. : Genetic diversity of *Bacillus cereus*/*B. thuringiensis* isolates from natural sources. Curr. Microbiol., 37, 80-87 (1998)
 15. Herve, A., Gominet, M., Okatad, O. A., Kolsto, A. B., and Lereclus, D. : PlcR is a pleiotropic regulator of extracellular virulence factor gene expression in *Bacillus thuringiensis*. Mol. Microbiol., 32(5), 1043-1053 (1998)
 16. Hsieh, Y. M., Sheu, S. J., Chen, Y. L., and Tsen, H. Y. : Enterotoxigenic profiles and polymerase chain reaction detection of *Bacillus cereus* group cells and *B. cereus* strains from foods and foodborne outbreaks. J. Appl. Microbiol., 87, 481-490 (1999)
 17. Juergensmeyer, M. A., Gingras, B. A., Restaino, L., and Frampton, E. W. : A selective chromogenic agar that distinguishes *Bacillus anthracis* from *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. J. Food Prot., 69, 2002-2006 (2006)
 18. Kaneko, T., Nozaki, R., and Aizawa, K. : Deoxyribonucleic acid relatedness between *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*. Microbiol. Immunol., 22, 639-641 (1978)
 19. Kim, M., and Choi, J. C. : Biotoxin involved in foodborne disease and their control enterotoxins and emetic toxin of *B. cereus*. Food Sci. Industry, 42(2), 2-19 (2009)
 20. Lee, S. H., Kim, B. J., Kim, J. H., Park, K. H., Kim, S. J., and Kook, Y. J. H. : Differentiation of *Borrelia burgdorferi sensu lato* on the basis of RNA polymerase (*rpoB*) sequences. J. Clin. Microbiol., 38, 2557-2562 (2000)
 21. Lyndsay, R., Agron, P. G., Hill, K. K., Jackson, P. J., Ticknor, L. O., Keim P., and Anderson, G. L. : Genome differences that distinguish *Bacillus anthracis* from *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. Appl. Environ. Microbiol., 69(5), 2755-2764 (2003)
 22. Natalla, I., Sorokin, A., Anderson, I., Galleron, N., Candelon, B., Kapratral, V., Bhattacharyya, A., Reznik, G., Mikhhalova, N., Lapidus, A., Chu, L., Mazur, M., Goltsman, E., Larsen, N., Haselkorn, R., Fonstein, M., Ehrlich, S. D., Overbeek, R., and Kyrpides, N. : Genome sequence of *Bacillus cereus* and comparative analysis with *Bacillus anthracis*. Nature, 423, 87-91 (2003)
 23. Radnedge, L., Agron, P. G., Hill, K. K., Jackson, P. J., Ticknor, L. O., Keim, P., and Anderson, G. L. : Genome differences that distinguish *Bacillus anthracis* from *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. Appl. Environ. Microbiol., 69, 2755-2764 (2003)
 24. Ruud A., Maagd, D., Bravo, A., and Crickmore, N. : How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. Trend in Genetics, 17(4), 193-199 (2001)
 25. Sabelnikov, A. G., and Ulyashova, L. V. : Plasmid transformation of *Bacillus cereus* on cellophane membrane. FEMS Microbiol. Lett., 72, 123-126 (1990)
 26. Ticknor, L. O., Kolsto, A. B., Hill, K. K., Keim, P., Laker, M. T., Tonks, M., and Jackson, P. J. : Fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis of Norwegian *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* soil isolates. Appl. Environ. Microbiol., 67, 4863-4873 (2001)
 27. Turnbell, P. C., Huston, R. A., Ward, M. J., Jones, M. N., Quinn, C. P., Finnie, N. J., Duggleby, C. J., Kramer, J. M., and Melling, J. : *Bacillus anthracis* but not always anthrax. J. Appl. Bacteriol., 72, 21-28 (1992)
 28. Vilas-Boas, G. T., Peruca, A. P. S., and Arantes, O. M. N. : Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, and *Bacillus thuringiensis*. Can. J. Microbiol., 53, 673-687 (2007)
 29. Wick, A., Jayaswal, N., Lereclus, D., and Andrup, L. : Characterization of plasmid pAW63, a second self-transformmissible plasmid in *Bacillus thuringiensis* subsp. kurstaki HD73. Microbiology, 144, 1263-1270 (1998)