



<https://bjm.ui.ac.ir/?lang=en>

Journal of Microbial Biology
E-ISSN: 3060-7647
14th Year, Vol. 14, No. 53, 2025 pp. 49-70
Received: 12/10/2024 Accepted: 25/12/2024

(Research Paper)

Isolation of Different *Bacillus* Species from the Soil of Yas Fatemi Forest Park and Investigation of Their Probiotic Properties

Sedigheh Gohari Heidari

Department of Microbiology, Faculty of Biosciences, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran
s.gohari1992@gmail.com

Abbas Akhavan Sepahy¹ 

Department of Microbiology, Faculty of Biosciences, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran
akhavansepahy@gmail.com

Sedigheh Mehrabian

Department of Microbiology, Faculty of Biosciences, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran
mehrabian_s@yahoo.com

Abstract

Soil, as one of the most important microbial ecosystems, serves as a habitat for the growth and reproduction of various microorganisms, including bacteria. Probiotics are live and beneficial microorganisms that, when consumed regularly, can improve overall health. Due to their immunological, functional and technological properties, probiotic bacteria are increasingly being proposed as health-promoting bacteria in various types of foods. In this study, samples were collected from six different points in the soil of Yas Fatemi Forest Park. After repeated culture for purification, initial identification of *Bacillus* species was carried out using catalase, citrate, sugar fermentation, motility, indole, lecithinase and gelatin hydrolysis tests. PCR was performed on the 16S rRNA gene for accurate strain identification. The phylogenetic tree of the superior strain was then constructed using Mega 7 software. Finally, the strains were tested for probiotic properties. In addition, the strains were evaluated for haemolytic activity, antimicrobial activity against *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* and antibiotic resistance. At the end of the experiments, one strain (C2c) exhibited the best resistance characteristics under conditions simulating the gastrointestinal system. It was also resistance to antibiotics such as gentamicin, streptomycin, clindamycin, tetracycline, chloramphenicol, vancomycin and levofloxacin, while demonstrating significant antimicrobial activity against the pathogenic strains tested. Finally, this bacterium was identified as *Bacillus subtilis* CFR08 using biochemical identification methods and 16S rRNA sequencing. In this study, a strain of *Bacillus subtilis* was isolated from the soil of Yas Fatemi Forest Park and introduced as a bacterium with probiotic properties that can be used in industries that require probiotic bacteria.

Keywords: Probiotic, *Bacillus subtilis*, bile salt, acidic pH, 16S rRNA

¹ Corresponding Author
3060-7647/ © 2025 The Authors



Introduction

Soil is one of the key ecosystems in the biological cycle, providing a rich environment for the discovery of new microorganisms due to its high microbial diversity. As a natural habitat for the growth and proliferation of bacteria, including probiotic bacteria, soil is of great importance in biological and industrial research. Probiotics are recognized as live and beneficial microorganisms that, when consumed regularly, can enhance overall health.

Due to their safety, functionality and technological properties, probiotic bacteria are increasingly being proposed as beneficial health-promoting agents in various foods. They play a crucial role in boosting the immune system, improving digestive health and preventing disease. Beyond digestive health, these bacteria are also effective in reducing inflammation and promoting general well-being.

With the growing demand for food and pharmaceutical products based on probiotics, the identification and exploitation of new sources of these bacteria, particularly from natural environments such as soil, has become a challenging but promising field of biological research. The soil microbiome plays a pivotal role not only in nutrient cycling, but also in supporting plant and animal health, making it a crucial focus of ecological studies. Extensive research on natural habitats like soil provides opportunities to uncover unique bacterial strains with novel applications in health and industry. The aim of this study is to identify and isolate *Bacillus* strains from the soil of Yas Fatemi Forest Park and evaluate their probiotic characteristics to enable their use in the production of health-promoting products.

Bacteria of the genus *Bacillus* are considered ideal candidates for use as probiotics due to their unique characteristics. These bacteria, which are natural inhabitants of the soil, can grow in harsh environmental conditions and form resistant spores that allow them to successfully compete with other microorganisms. Their spores are resistant to unfavourable conditions such as low stomach pH, radiation, high temperatures, and chemical agents, making refrigeration unnecessary.

Unlike bacteria such as *Lactobacillus*, which lack spore-forming proteins, *Bacillus* species are more stable under storage and processing conditions due to their resistant spores. This characteristic has made them a suitable replacement for more sensitive species in the food and probiotic industries.

The desirable properties of *Bacillus* as a probiotic include resistance to gastric acid, bile salts and digestive enzymes, non-pathogenicity and high safety, ability to fight pathogens and prevent their adhesion to the intestinal mucosa, ability to colonise in the gut, and stimulation of immune responses. These properties make *Bacillus* one of the most effective probiotics for promoting public health and for use in the food industry.

Materials and Methods

In this study, soil samples were collected from six different locations within Yas Fatemi Forest Park to identify and isolate probiotic strains. The samples were transferred to the laboratory and subjected to successive culture processes for strain isolation and purification. Initial identification was carried out using a series of biochemical tests including Gram staining, catalase, citrate utilization, sugar fermentation, motility, indole production, lecithinase activity and gelatin hydrolysis.

PCR analysis of the 16S rRNA gene was then performed for further identification. Given the importance of DNA quality and purity, a commercial kit from SinaClon was used for DNA extraction instead of the boiling method. Finally, the superior strains were sent to the GenIran laboratory for sequencing. The resulting sequences were compared using databases.

To study the phylogeny of the bacterial species, a phylogenetic tree was constructed from the aligned sequences using the neighbour joining method with MEGA7 software.

Probiotic properties were evaluated by tests such as tolerance to acid pH, bile salts (0.3%), growth ability at different temperatures and sodium chloride concentrations, and antimicrobial activity against pathogenic bacteria including *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus*.

Additionally, sensitivity to various antibiotics, including gentamicin, streptomycin and tetracycline, was assessed to determine the clinical potential of the strains.

Results

In this study, 15 *Bacillus* strains were isolated from the soil of Yas Fatemi Forest Park in Tehran. Phylogenetic analysis of the 16S rRNA sequence of isolate C2C revealed its closest genetic relationship with *Bacillus subtilis*

CFR08. The growth of the strains under acidic conditions and in the presence of bile salts was measured at different times using a spectrophotometer.

Of the 15 strains, 11 showed a high tolerance to acidic conditions (pH = 4) and varying concentrations of sodium chloride. Antibiotic sensitivity tests indicated that these strains were sensitive to antibiotics such as gentamicin, streptomycin, clindamycin, tetracycline, chloramphenicol, vancomycin and levofloxacin.

Four strains lacked haemolytic activity, making them safe candidates for biological applications. As bile salt resistance is a key feature for the selection of effective probiotics, only one strain, named C2C, showed high resistance to bile salts (0.3%). Moreover, this strain exhibited all the probiotic properties evaluated, including tolerance to simulated gastrointestinal conditions and strong antimicrobial activity.

Due to its high resistance to challenging environmental conditions, this strain was identified as the best candidate for use in the food and pharmaceutical industries.

Discussion and Conclusion

The results of this study showed that the soil of Yas Fatemi Forest Park is a rich source of *Bacillus* bacteria and a strain with unique probiotic characteristics, *Bacillus subtilis* CFR08, was identified. This strain is a suitable candidate as a potential probiotic due to its high tolerance to acid and bile conditions, lack of haemolytic activity and strong antimicrobial activity against pathogenic bacteria.

The findings suggest that the C2C strain has significant potential for use in probiotic products and can play an effective role in promoting public health. Given its sensitivity to various antibiotics, the safety of this strain for use in dietary supplements has been confirmed.

However, as this study did not include *in vivo* experiments to assess the bacterium's ability to adhere to epithelial cells and its hydrophobicity, further research, including *in vivo* experiments and molecular analysis, is recommended to fully assess the safety and efficacy of this strain as a viable probiotic.

This study represents an important step towards identifying natural sources of probiotic bacteria and may contribute to the development of health-oriented products, opening up new horizons for the exploitation of natural ecosystems. Future studies could focus on optimizing the cultivation and storage processes of these strains for industrial applications.

جداسازی انواع باسیلوس‌ها از خاک پارک جنگلی یاس فاطمی و بررسی خواص پروبیوتیکی آنها

صدیقه گوهری حیدری

گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران

s.gohari1992@gmail.comعباس اخوان سپهی * 

گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران

akhavansepahy@gmail.com

صدیقه مهراییان

گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران

mehrabian_s@yahoo.com

چکیده

خاک به‌عنوان یکی از مهم‌ترین اکوسیستم‌های میکروبی محل رشد و تکثیر انواع مختلف میکروارگانیسم‌ها از جمله باکتری‌ها است. پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده و مفید هستند که در صورت مصرف منظم، می‌توانند سلامت عمومی را بهبود بخشند. باکتری‌های پروبیوتیک، به دلیل ویژگی‌های ایمنی، عملکردی و تکنولوژیکی‌شان، به‌عنوان باکتری‌های سالم برای ارتقای سلامت در انواع مختلف غذا به‌طور فزاینده‌ای پیشنهاد شده‌اند. در این تحقیق از ۶ نقطه مختلف از خاک پارک جنگلی یاس فاطمی نمونه‌برداری انجام شد که پس از کشت‌های متوالی برای خالص‌سازی، شناسایی اولیه با تست کاتالاز، سترات، تخمیر قندها، حرکت، اندول، لیستیناز و هیدرولیز ژلاتین برای جداسازی باسیلوس‌ها انجام گرفت. به‌منظور شناسایی دقیق سویه، تست PCR روی ژن *16S rRNA* انجام شد. سپس درخت فیلوژنتیکی سویه برتر توسط نرم‌افزار مگا ۷ رسم شد؛ درنهایت، تست‌های مربوط به خواص پروبیوتیکی روی سویه‌ها انجام شدند. همچنین سویه‌ها از نظر فعالیت همولیتیک و فعالیت ضد میکروبی در برابر باکتری‌های *Staphylococcus aureus* و *Salmonella*، *Escherichia coli* و مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها ارزیابی شدند. در پایان آزمایش، یک سویه (C2c) بهترین ویژگی‌های مقاومتی به شرایط مشابه دستگاه گوارش را نشان داد. همچنین، نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین، استرپتومایسین، کلیندامایسین، تتراسایکلین، کلرامفنیکل، وانکومایسین و لووفلوکساسین مقاومت کرد؛ درحالی‌که فعالیت ضد میکروبی مناسبی علیه سویه‌های پاتوژن آزمایش شده نشان داد؛ درنهایت، این باکتری با به‌کارگیری روش‌های شناسایی بیوشیمیایی و توالی‌یابی *16S rRNA* به‌عنوان *Bacillus subtilis* CF08 شناسایی شد. در این مطالعه سویه *Bacillus subtilis* از خاک پارک جنگلی یاس فاطمی جداسازی شد و به‌عنوان باکتری دارای ویژگی‌های پروبیوتیک معرفی شد که می‌تواند در صنایع مصرف‌کننده باکتری‌های پروبیوتیک استفاده شود.

واژگان کلیدی: پروبیوتیک، *Bacillus subtilis*، نمک صفراوی، pH اسیدی، *16S rRNA*

* نویسنده مسئول مکاتبات

گوهری حیدری صدیقه، اخوان سپهی عباس، مهراییان صدیقه. جداسازی انواع باسیلوس‌ها از خاک پارک جنگلی یاس فاطمی و بررسی خواص پروبیوتیکی آنها. زیست‌شناسی

DOI: 10.22108/bjm.2024.143024.1617. ۷۰-۴۹: (۵۳)۱۴; ۱۴۰۴

3060-7647/ © 2025 The Authors

This is an open access article under the CC BY-NC-ND/4.0/ License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

مقدمه

خاک به‌عنوان یکی از مهم‌ترین اکوسیستم‌های میکروبی محل رشد و تکثیر انواع مختلف میکروارگانیسم‌ها از جمله باکتری‌ها، قارچ‌ها، جلبک‌ها، گل‌سنگ‌ها و پروتوزوآها است. در بین آنها باکتری‌ها فراوان‌ترین میکروارگانیسم‌های موجود در خاک هستند (1). *Bacillus* یک باکتری گرم مثبت، میله‌ای شکل، اسپورساز، هوازی یا بی‌هوازی اختیاری است. وجود این باکتری در خاک نشان‌دهنده طیف وسیعی از توانایی‌های فیزیولوژیکی این ارگانیسم برای رشد در هر محیط و رقابت مطلوب با ارگانیسم‌های دیگر موجود در محیط به‌دلیل قابلیت تشکیل اسپورهای بسیار مقاوم است. *Bacillus*ها متابولیت‌هایی را تولید می‌کنند که دارای اثرات آنتاگونیستی بر سایر میکروارگانیسم‌ها هستند. گونه‌های *Bacillus* تشکیل‌دهنده اسپور به‌دلیل توانایی آنها در تحمل شرایط گوارشی سخت و مزایای سلامتی که به میزبان می‌دهد، به‌عنوان پروبیوتیک به بازار عرضه می‌شوند. پروبیوتیک‌ها مکمل‌های غذایی حاوی میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که برای سلامتی میزبان مفیدند. براساس تعریف جدید ارائه‌شده توسط WHO/FAO پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که اگر در مقادیر کافی تجویز شوند اثرات مفید سلامتی بر میزبان خواهند داشت.

ویژگی عمومی پروبیوتیک‌ها

پروبیوتیک‌های ایدئال ویژگی‌های متعددی دارند؛ از جمله مقاومت نسبت به اسید معده، املاح صفراوی، آنزیم‌های گوارشی و مراحل فرآوری و تولید، قابلیت اتصال به سلول‌های اپیتلیال روده، غیربیماری‌زا و غیرتهاجمی بودن، توانایی حفظ و پایداری ژنتیکی، توانایی مقابله با عوامل بیماری‌زا. همچنین، آنها جزئی از میکروفلوراها هستند، در تنظیم پاسخ‌های ایمنی نقش دارند و قابلیت کلونیزه شدن در دستگاه گوارش انسان را دارند (2,3).

تجزیه و تحلیل تمام سویه‌های پروبیوتیک از *Bacillus*

Lactobacillus نشان می‌دهد این باکتری‌ها به‌عنوان دارو و مکمل‌های غذایی حیوانات، آبزیان و رژیم غذایی انسان‌ها استفاده می‌شوند. پروتئین‌های اسپورزا در حفظ تمام سویه‌های پروبیوتیک *Bacillus* ضروری هستند. اعضای *Bacillus* در شرایط کمبود مواد مغذی و استرس محیطی، اندوسپورهای خفته مقاوم را تشکیل می‌دهند که باعث می‌شود آنها در برابر pH پایین معده، تابش اشعه ماوراءبنفش، دمای بالا و حلال‌ها مقاوم باشند و بدون یخچال نگهداری شوند (4).

معیار ایمنی برای انتخاب پروبیوتیک

ارزیابی ایمنی یک پروبیوتیک با شناسایی صحیح سویه‌ها و شناسایی طبقه‌بندی یک میکروارگانیسم براساس یکپارچه‌سازی خواص فنوتیپی و ژنوتیپی ضروری است. متمایز کردن آن از خویشاوندان بیماری‌زا یا سایر اعضای میکروارگانیسم‌های مضر، شناسایی فنوتیپی باکتری‌های پروبیوتیک با استفاده از میکروبیولوژیک کلاسیک رویکردها برای شناسایی گونه‌ها مهم است؛ اما همیشه قابل اطمینان نیست و گونه‌های خاصی را نمی‌توان تنها با این روش‌ها تشخیص داد. شناسایی گونه‌های باسیلوس در سطح گونه، اغلب باید با استفاده از روش‌های مولکولی شناسایی سطح گونه‌ها تأیید شوند؛ با این حال، توالی (*16S rRNA*) DNA متکی بر تجزیه و تحلیل توالی *16S rRNA* به تنهایی تکنیک کافی برای افتراق را فراهم نمی‌کند (5).

برتری اسپورفرم‌ها بر فرم‌های رویشی

گونه‌های *Bacillus* توانایی اسپوراسیون را دارند و اندوسپور بیضی شکل در هر سلول تشکیل می‌دهند. آنها برای زنده ماندن در فشارهای محیطی و شرایط سخت رشد، نگهداری، ذخیره و توزیع سازندهای اسپور تحمل و ماندگاری زیادی در دمای شدید، pH پایین، مایعات صفراوی، نمک، کم‌آبی بدن یا تغذیه نامناسب از خود نشان می‌دهند. باوجود هوازی یا بی‌هوازی اختیاری، این باکتری

هنوز می‌تواند در شرایط هوایی تشکیل اسپور دهد (6). نمونه‌برداری شده نیز یادداشت شد که در جدول ۱ آورده شده‌اند.

جدول ۱: برخی پارامترهای نمونه‌های خاک و ویژگی نقاط نمونه‌برداری شده

Table 1: Selected Soil Sample Parameters and Characteristics of Sampling Points

pH	دما (°C)	زمان	طول و عرض جغرافیایی	نقاط نمونه برداری
۷	۳۱	۱۴:۵۵	N: 35°/77 E: 51°/54	A
۷	۳۰	۱۵:۱۰	N: 35°/76 E: 51°/55	B
۸	۳۱	۱۵:۳۰	N: 35°/77 E: 51°/54	C
۸	۳۰	۱۵:۴۵	N: 35°/77 E: 51°/54	D
۸	۳۰	۱۵:۵۵	N: 35°/77 E: 51°/54	E
۸	۳۰	۱۶:۱۰	N: 35°/76 E: 51°/55	F

کشت و جداسازی باسیلوس‌ها

نمونه‌ها پس از انتقال توسط الک استریلی به قطر ۲ میلی‌متر الک شدند. ۱ گرم از خاک الک‌شده به داخل لوله‌های آزمایش، ریخته و به آن ۹ میلی‌لیتر آب مقطر استریل اضافه شد. سپس نمونه‌های سوسپانسیون خاک در بن‌ماری با درجه حرارت ۸۰ سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شدند. با این روش تنها باکتری‌های اسپوردار خاک باقی ماندند. سپس ۹ رقت پشت سر هم، تهیه و ۱ میلی‌لیتر از رقت آخر بیرون ریخته شد. هر رقت در پلیت نوترینت آگار به روش پورپلیت کشت داده شد و پلیت‌ها به منظور ترکیب سوسپانسیون میکروبی با محیط کشت به‌طور چرخشی در جهت و خلاف جهت عقربه‌های ساعت روی میز چرخانیده و سپس در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت در شرایط هوایی انکوبه شدند.

سپس کلنی‌ها از لحاظ ماکروسکوپی بررسی شدند. کلنی باسیلوس‌ها معمولاً خشن، خشک، مضرس و شیری است؛ حتی اگر موکوئیدی باشد، در کشت‌های کهنه به‌صورت

اسپوراسیون *Bacillus* علاوه بر اینکه می‌تواند با تمام شدن مواد مغذی القا شود، با قراردادن سلول‌ها در بعضی شرایط نامساعد محیطی دیگر از جمله افزایش pH و دما نیز القا می‌شود. وجود اسپورها این اجازه را به آنها می‌دهد که در حرارت پایدار، ذخیره‌سازی طولانی‌مدت انجام شود و آماده‌سازی بدون نیاز به نگه‌داشتن در یخچال یا نیاز به کپسول‌سازی فراهم شود (7).

Bacillus کاندید مناسب برای پروبیوتیک

اسپورهای *Bacillus* از طریق تعدیل سیستم ایمنی، حذف رقابتی از عوامل بیماری‌زای دستگاه گوارش و ترشح ترکیبات ضد میکروبی که رشد باکتری‌های مضر را سرکوب می‌کنند، اثر پروبیوتیکی دارند. تعدادی از گونه‌های *Bacillus* به‌عنوان پروبیوتیک مؤثر و مفید شناخته شده‌اند؛ اما برخی از گونه‌های آن دارای ژن‌های ویروالانسی هستند که عامل اصلی بیماری‌اند؛ بنابراین، باید قبل از استفاده به‌عنوان پروبیوتیک از نظر ایمنی بررسی شوند (8,9).

سویه‌های خاص *Bacillus* با خواص پروبیوتیک

جنس *Bacillus* شامل اعضای گرم مثبت اسپورساز هوایی یا هوایی اختیاری است. سویه‌های با خواص پروبیوتیک ادعا شده شامل *Bacillus subtilis*, *Bacillus coagulans* و *Bacillus cereus* هستند (10).

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری از خاک

نمونه‌برداری از ۶ نقطه با عرض جغرافیایی مختلف که در تماس مستقیم آفتاب نبود، با قاشق استریل از عمق ۳ تا ۸ سانتی‌متری خاک در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در فصل بهار انجام شد. نمونه‌های خاک به داخل زیپ کیپ‌های استریل از قبل تهیه‌شده، منتقل و با رعایت موارد نمونه‌برداری میکروبی به آزمایشگاه منتقل شدند. ویژگی نقاط

اگر باکتری قادر به تخمیر سوبسترای محیط کربوهیدراتی باشد، با تولید اسید pH را کاهش می‌دهد و معرف فنول رد در pH اسیدی از قرمز روشن یا گلبهی به زرد تغییر رنگ می‌دهد که این امر نشان‌دهنده مثبت بودن واکنش است.

آزمون اندول و حرکت

هدف از این آزمون، بررسی توانایی باکتری‌ها در تجزیه اسید آمینه تریپتوفان توسط آنزیم تریپتوفاناز و بررسی وضعیت حرکت باکتری است. در این آزمون از محیط نیمه جامد (سولفور ایندول موتیلیتی) استفاده شده است. باکتری به صورت کشت عمقی در محیط، تلقیح و بعد از گرماگذاری برای بررسی نتیجه، روی محیط کشت معرف کواکس اضافه شد. در صورت مثبت بودن تست اندول حلقه قرمز رنگی روی محیط ایجاد می‌شود. برای بررسی حرکت، اگر محیط کدر شده باشد یا در راستای تلقیح کدورت دیده شود، تست حرکت نیز مثبت است.

آزمون هیدرولیز ژلاتین

این آزمون به منظور بررسی توانایی عده‌ای از میکروارگانیسم‌ها در هیدرولیز یا ذوب ژلاتین استفاده می‌شود. برای بررسی هیدرولیز ژلاتین از محیط نوترینت برات استفاده می‌شود که حاوی ۱۲ درصد پودر ژلاتین است. باکتری به روش کشت عمودی در محیط، تلقیح و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. سپس در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شد تا افتراق ژلاتینی که توسط دمای محیط ذوب شده است با ژلاتینی که توسط باکتری بعد از هیدرولیز تبدیل به مایع می‌شود، مشخص شود. بعد از این مدت کشت‌هایی که به حالت مایع باقی بمانند، دارای آنزیم ژلاتیناز هستند و نتیجه آزمون به علت هیدرولیز سریع ژلاتین، ژلاتیناز مثبت قوی گزارش می‌شود. کشت‌هایی که به حالت جامد باقی مانده‌اند، دوباره به مدت ۵ روز انکوبه شدند و نتیجه آنها مجدداً بررسی می‌شود.

مضرس است. نمونه‌ها با اشکال متفاوت، جدا و برای مرحله رنگ‌آمیزی آماده شدند. گفتنی است تمامی کارهای این تحقیق با وسایل استریل و کنار شعله انجام گرفته‌اند.

آزمایشات مورفولوژی و بیوشیمیایی

تست کاتالاز

آزمون به منظور شناسایی میکروارگانیسم‌هایی استفاده می‌شود که دارای آنزیم‌های کاتالاز هستند و قادرند با استفاده از آن پراکسید هیدروژن را تجزیه کنند. آزمایش کاتالاز برای تشخیص دو گروه از باکتری‌های گرم مثبت اسپوردار، یعنی باسیلوس‌ها و کلستریدیوم‌ها به کار می‌رود. به منظور انجام آزمایش، روی یک لام یک قطره از سوسپانسیون باکتری مدنظر قرار داده و سپس یک قطره از محلول ۳ درصد پراکسید هیدروژن روی لام اضافه شد. در صورت مثبت بودن آزمایش، حباب‌های گاز اکسیژن بلافاصله مشاهده می‌شود.

فعالیت همولیتیک

تست همولیتیک سوبه‌های باکتریایی به صورت کشت خطی (زیگزاک) روی محیط بلاد آگار (محیط پایه حاوی ۵ درصد خون گوسفندی دفیبرینه) انجام شد و بعد به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. سوبه‌های غیرهمولیتیک برای تجزیه و تحلیل بیشتر خاصیت پروبیوتیکی انتخاب شدند.

تست تخمیر قندها

برای آزمون تخمیر کربوهیدرات‌ها، اغلب از معرف فنل رد استفاده می‌شود. برای این منظور به محیط پایه ذکر شده هر بار یک قند به میزان ۰/۵ درصد اضافه شد؛ البته محیط پایه به صورت جداگانه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو شد و بعد از خنک شدن، هر یک از قندها با فیلتر سرنگی برای استریل شدن به محیط اضافه شدند. سپس محیط‌ها در لوله‌های آزمایش توزیع شدند و باکتری در آنها کشت داده شد و پس از کشت باکتری در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸-۲۴ ساعت انکوبه شدند؛ در نهایت،

آزمون سیترات

این آزمون به منظور شناسایی میکروارگانیسم‌هایی به کار می‌رود که از سیترات به عنوان تنها منبع کربن استفاده می‌کنند. برای انجام این آزمون از محیط افتراقی سیمون سیترات آگار استفاده می‌شود. این محیط شامل سیترات سدیم به عنوان تنها منبع کربن محیط، املاح آمونیم به عنوان منبع ازت و معرف بروموتیمول بلو (BTB) است. این معرف در pH خنثی به رنگ سبز و در pH قلیایی به رنگ آبی دیده می‌شود. بعد از تهیه محیط و استریلیزاسیون، لوله‌های حاوی محیط به صورت مورب قرار داده شدند تا محیط سفت شود و سپس باکتری به صورت عمقی و در ادامه روی سطح مورب کشت داده شد. سپس محیط به مدت ۲۴-۴۸ در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شده است. اگر باکتری قادر به استفاده از محیط باشد، رنگ محیط به دلیل قلیایی شدن از رنگ سبز به رنگ آبی تغییر پیدا می‌کند.

آزمون لیستیناز

برای تعیین لیستیناز، سویه‌ها روی محیط پایه نوترینت آگار حاوی تخم‌مرغ کشت داده شده‌اند. بدین منظور ابتدا تخم‌مرغ با آب گرم و صابون و سپس با الکل ۷۰ درصد شسته شده است. تخم‌مرغ شکسته شد و زرده آن با ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل، مخلوط و بلافاصله به ارلن حاوی محیط نوترینت آگار منتقل شد که از قبل اتوکلاو شده و خنک است. سپس زرده هم زده شد و به مدت ۲۴-۴۸ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شده است. در صورت مثبت بودن تست، هاله‌ای اطراف کلونی‌های باکتری دیده می‌شود.

نگهداری سویه‌ها

برای نگهداری سویه‌ها ذخیره‌سازی کوتاه‌مدت، به دو روش پاساژهای متوالی و کشت روی آگار شیب‌دار انجام شده است.

شناسایی سویه برتر با استفاده از روش‌های مولکولی

پس از جمع‌آوری نمونه‌های باکتری مطالعه‌شده و

غربالگری‌های مدنظر و همچنین پس از بررسی‌های بیوشیمیایی، برای شناسایی دقیق باکتری مجهول، روش مولکولی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز یا PCR انجام شده است. به منظور شناسایی مولکولی باکتری مجهول در ابتدا DNA باکتری با استفاده از کیت استخراج شده است.

استخراج DNA

استخراج DNA با استفاده از کیت خریداری‌شده از شرکت سیناکلون Catalog Number: EX6071 به روش ذیل انجام شده است:

- ۱- کشت باکتری در محیط LB broth (معادل $1/5 \times 10^8$ ml) به مدت ۲۴ ساعت (Cfu/)
- ۲- اضافه کردن ۴۰۰ میکرولیتر Lysis buffer و ورتکس با بیشترین سرعت به مدت ۲۰ ثانیه
- ۳- اضافه کردن ۳۰۰ میکرولیتر محلول precipitation و ورتکس با بیشترین سرعت به مدت ۵ ثانیه
- ۴- انتقال محلول به ستون و جمع‌آوری به وسیله پیپت
- ۵- سانتریفیوژ تیوب با دور 13000 g-force به مدت ۱ دقیقه
- ۶- انتقال به تیوب جمع‌آوری جدید و اضافه کردن ۴۰۰ میکرولیتر wash buffer I و سانتریفیوژ با دور 13000 g-force به مدت ۱ دقیقه
- ۷- شست‌وشوی ستون با ۴۰۰ میکرولیتر wash buffer II و سانتریفیوژ با دور 13000 g-force به مدت ۱ دقیقه
- ۸- شست‌وشوی ستون با ۴۰۰ میکرولیتر wash buffer II و سانتریفیوژ با دور 13000 g-force به مدت ۱ دقیقه
- ۹- قراردادن ستون در تیوب جمع‌آوری و سانتریفیوژ با دور 13000 g-force به مدت ۱ دقیقه
- ۱۰- اطمینان از انتقال ستون به تیوب $1/5$ میلی‌لیتر جدید و اضافه کردن ۳۰ میکرولیتر elution buffer گرم شده تا دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد، انکوبه کردن به مدت ۳-۵ دقیقه در ۶۵ درجه سانتی‌گراد و سانتریفیوژ با دور 13000 g-force به مدت ۱ دقیقه.

الکتروفورز نمونه‌های DNA
به‌منظور تأیید نمونه‌های DNA استخراج شده از ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز استفاده شد. برای تهیه ژل از ۰/۲۵ پودر آگارز و ۲۵ میلی‌لیتر بافر TBE استفاده شده است.

ترسیم درخت فیلوژنتیکی

پس از تحلیل توالی سویه مدنظر درخت فیلوژنتیک رسم شد. در این پژوهش رسم درخت فیلوژنتیک با استفاده از نرم‌افزار مگا ۷ با روش پیوند همجواری (Neighbor_Joining) انجام شد. به این صورت که هم‌ردیفی توالی ژن *16S rRNA* نمونه‌ها به همراه تعدادی از گونه‌های جنس باسیلوس به روش ClastalW در برنامه مگا ۷ انجام گرفت و سپس ارتباط تبارشناسی سویه‌ها با روش همجواری مشخص شد. اساس این روش حداقل کردن طول درخت است. فواصل فیلوژنتیکی با استفاده از روش حداکثر درست‌نمایی مرکب (Maximum composite likelihood method) محاسبه شدند و براساس واحدهای تعداد جایگزینی بازها در هر مکان بیان می‌شوند. شایان ذکر است ارزش بوت استریپ از ۱۰۰۰ تکرار در بالای شاخه‌ها نشان داده شده است و شاخه‌های بالای ۵۰ درصد قابل استناد محسوب می‌شوند.

بررسی خواص پروبیوتیکی

مقاومت به pH اسیدی تا قلیایی

به‌منظور بررسی مقاومت باکتری‌ها به اسید، از محیط نوترینت برات استریل استفاده شد که به کمک اسید کلریدریک (HCL) ۵ درصد نرمال و سود (NAOH) ۵ درصد نرمال، pH در حد ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸ و ۹ تنظیم شد.

۱۰۰ میکرولیتر از باکتری‌های تازه کشت شده به این محیط، انتقال و در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. توانایی رشد باکتری‌های مطالعه شده در ابتدا با مشاهده تغییرات کدورت، بررسی و نتایج به شکل مثبت یا منفی درج شد. سپس رشد سویه منتخب در زمان‌های ۰، ۴، ۶، ۸، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در طول موج ۶۰۰ نانومتر به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)

جدول ۲: برنامه PCR
جدول ۳: ترکیب مخلوط واکنش برای PCR

مرحله	دما	زمان
واسرشتی اولیه	۹۵ ⁰ C	۱۰ min
واسرشتی	۹۵ ⁰ C	۱ min
اتصال	۴۵ ⁰ C	۱ min
گسترش	۷۲ ⁰ C	۱:۳۰ min
گسترش نهایی	۷۲ ⁰ C	۱۰ min

جدول ۳: ترکیب مخلوط واکنش برای PCR

Table 3: Reaction Mixture Composition for PCR

ماده	مقدار
DNA باکتری	۱۸
پرایمر F	۱۸
پرایمر R	۱۸
مسترمیکس (آنزیم Taq، بافر آنزیم، MgCl ₂ ، DNTP)	۱۰۸
آب مقطر	۱۲۸

به‌منظور تأیید PCR انجام شده، الکتروفورز روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد. شایان ذکر است از آنجایی که پرایمرهای طراحی شده جزء پرایمرهای شناخته شده گزارش شده است، طول محصول این پرایمرها حدود ۱۴۸۷ جفت‌باز است؛ یعنی بازه‌ای که می‌توان به آن استناد کرد بین ۱۴۰۰ تا ۱۵۰۰ جفت‌باز است. (11) به همین دلیل، در این پژوهش از

آنتی‌بیوگرام

به منظور بررسی حساسیت نمونه‌های باکتری به آنتی‌بیوتیک تست آنتی‌بیوگرام انجام شد. در ابتدا یک لوپ از باکتری مدنظر در لوله استریل حاوی ۳-۲ میلی‌لیتر آب مقطر یا سرم فیزیولوژی حل شد. با کمک سواب استریل از سوسپانسیون تهیه شده نمونه برداشته و آب اضافی خارج شد. سوآپ آغشته به باکتری مدنظر روی محیط مولر هیتون آگار استریل در جهات مختلف به صورت متراکم کشت داده شد و با استفاده از پنس استریل دیسک‌ها با فاصله ۲۴-۲۰ میلی‌متر از یکدیگر و از لبه پلیت ۱/۵-۱ سانتی‌متر روی محیط قرار داده شدند. سپس پلیت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴-۱۸ ساعت انکوبه شد. قطر هاله عدم رشد با خط کش یا کولیس، اندازه‌گیری و با جدول شرکت سازنده دیسک مقایسه شد. جواب‌ها به صورت حساس (Sensetive)، نیمه‌حساس (Intermediate) و مقاوم (Resistant) گزارش می‌شوند. مقاومت آنتی‌بیوتیکی با استفاده از روش انتشار دیسک به محیط آگار انجام گرفت.

بررسی مقاومت به گرما

با توجه به اینکه اسپور باسیلوس دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد را ۲۰ دقیقه یا حتی بیشتر می‌تواند تحمل کند، نمونه اولیه با غلظت نیم مک فارلند از هر نمونه در سرم فیزیولوژی، تهیه و به مدت ۲۰ دقیقه در بن‌ماری ۱۰۰ درجه (نقطه جوش) قرار داده شد. سپس از هر یک از لوله‌ها به صورت سریالی پورپلیت در محیط‌های نوترینت آگار، تهیه و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در دمای ۱۰۱ درجه سانتی‌گراد، اسپورهای حساس به حرارت باسیلوس می‌توانند به فرم مقاوم تبدیل شوند.

مقاومت به نمک سدیم کلرید

سویه‌ها در محیط نوترینت برات حاوی رقت‌های ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ درصد از نمک سدیم کلرید کشت داده شدند. سپس لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد

قرار داده شدند. جذب نوری باکتری‌ها در زمان‌های ۰، ۲، ۴، ۶، ۸، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت اندازه‌گیری شد.

بررسی مقاومت به نمک صفراوی

۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی تازه معادل نیم مک فارلند برداشت شد. این باکتری‌ها در شرایط استریل به محیط‌های نوترینت برات حاوی ۳/۰ درصد نمک صفراوی استریل و محیط کشت فاقد بایل (به‌عنوان بلانک) اضافه شدند. جذب نوری (OD) محیط‌ها قبل از گرمخانه‌گذاری در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. سپس رشد باکتری در زمان‌های ۰، ۲، ۴، ۶، ۸، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر بررسی شد. سپس ضریب بازدارندگی نمونه‌ها با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد.

$$\text{Cinh} = \frac{(T8 - T_{\text{control}} - T8_{\text{treatment}})}{T8 - T_{\text{control}}}$$

Co-efficient ضریب بازدارندگی رشد

Cinh: of inhibition

جذب نوری در محیط کشت بدون بایل

، پس از ۸ ساعت گرمخانه‌گذاری T8

Control:

جذب نوری در محیط کشت بدون بایل،

قبل از گرمخانه‌گذاری T0 Control:

جذب نوری در محیط کشت حاوی

بایل، پس از ۸ ساعت گرمخانه‌گذاری

T8 Treatment:

جذب نوری در محیط کشت حاوی

بایل، قبل از گرمخانه‌گذاری T0

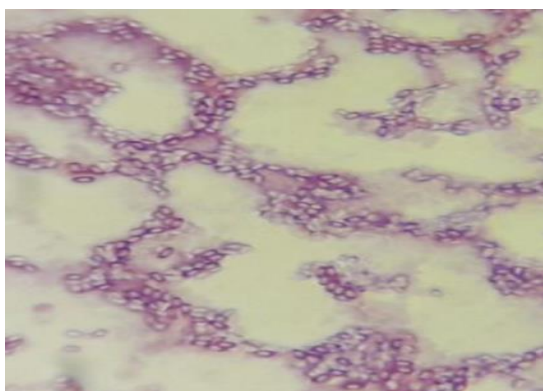
Treatment:

اگر ضریب بازدارندگی کمتر از ۰/۵ باشد، باکتری پروبیوتیک از نظر تحمل نمک صفرا قابل قبول است.

فعالیت ضد میکروبی

ابتدا از باکتری‌های پاتوژن (اشرشیا کولی، سالمونلا، استافیلوکوکوس اورئوس) سوسپانسیون نیم مک فارلند تهیه شد. سپس توسط سوآپ استریل از سوسپانسیون میکروبی،

منفی و رنگ زرد و نارنجی پررنگ به صورت مثبت گزارش شده‌اند. با توجه به شکل ۲، از بین ۱۵ سویه جدا شده، همه سویه‌ها توانایی تخمیر گلوکز را داشتند و ۸۰ درصد سویه‌ها توانایی تخمیر مانیتول و آرابینوز و ۴ سویه توانایی تخمیر قند گزایلو را داشتند.



شکل ۱: نمایی از اشکال باسیلی بنفش رنگ (گرم مثبت) زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۱۰۰*

Figure 1: View of Purple *Bacillus* Shapes (Gram-Positive) Under Light Microscope at 100x Magnification

برداشت و روی محیط مولر هینتون آگار به صورت چمنی کشت داده شد. سپس حفره‌ای در مرکز هر پلیت توسط پیست پاستور استریل، ایجاد و از سوسپانسیون باکتری مدنظر با سمپلر به میزان ۱۰ میکرولیتر درون حفرات ایجاد شده اضافه شد.

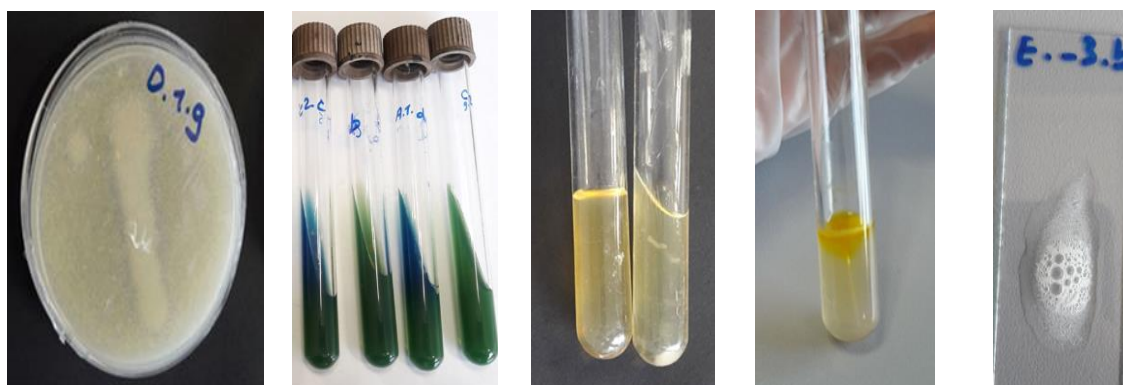
نتایج

رنگ آمیزی گرم و تست کاتالاز

برای شناسایی باکتری‌ها، تست‌های شناسایی براساس روش برجی انجام گرفت. کلونی‌های خالص به دست آمده در هر پلیت برای آزمون‌های رنگ آمیزی، تست کاتالاز و مورفولوژی در زیر میکروسکوپ قرار گرفتند (شکل ۱).

نتایج تست تخمیر قند

به منظور بررسی تولید گاز در محیط قندی گلوکز از لوله درهام استفاده شد. هرگونه تغییر رنگ از قرمز به زرد در محیط فنول رد حاوی منابع قندی نشان‌دهنده توانایی تخمیر قند مدنظر توسط باکتری است. در این آزمایش رنگ قرمز



شکل ۲: نتایج تست هیدرولیز قندها از چپ به راست گلوکز، مانیتول، آرابینوز، گزایلو (تغییر رنگ لوله از قرمز نشان‌دهنده مثبت بودن تست است).
Figure 2: Results of Sugar Hydrolysis Test (From Left to Right: Glucose, Mannitol, Arabinose, Xylose). A Color Change from Red Indicates a Positive Test.

نتایج آزمون هیدرولیز ژلاتین

توانایی تولید آنزیم ژلاتیناز نیز در سویه‌های باکتریایی به عنوان شاخص دیگری از ارزیابی ایمنی بررسی شده است. این آنزیم می‌تواند ژلاتین و ترکیباتی مانند کلاژن، کازئین و ... را حذف کند. بررسی‌ها نشان می‌دهند در باکتری‌های

نتایج آزمون تولید اندول و حرکت

در محیط SIM سویه‌ها از نظر ایجاد اندول و حرکت بررسی شدند (شکل ۳). سویه‌های پروبیوتیکی بهتر است اندول مثبت باشند. کدورت در مسیر آنس در محیط کشت نشان‌دهنده حرکت مثبت باکتری است.

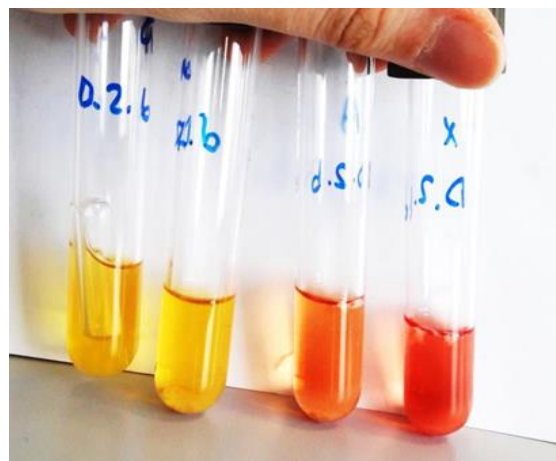
نتایج آزمون لیستیناز

در این آزمون سویه‌های دارای آنزیم لیستیناز می‌توانند در محیط ایجاد هاله کدر یا رسوبی کنند. علت ایجاد هاله در اطراف کلونی ره‌اشدن چربی‌های آزاد از امولوسیون زرده تخم‌مرغ، پس از شکسته شدن لیستین (لیستین در امولوسیون زرده تخم‌مرغ نقش پایدارکننده را به عهده دارد) و پروتئین‌های نامحلول زرده تخم‌مرغ است که بر اثر آزاد شدن چربی‌ها رسوب می‌کند. تمامی سویه‌ها لیستیناز مثبت گزارش شدند که در شکل ۳ آمده‌اند.

نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی و تست‌های تأییدی

با توجه به نتایج حاصل از آزمون‌های تست کاتالاز و سایر تست‌های تأییدی شامل تست سیرتات، تست حرکت، تست تخمیر قندها، آزمون‌های هیدرولیز ژلاتین و لیستیناز، سویه مدنظر به صورت تخمینی به‌عنوان جنس باسیلوس مشخص شد. نتایج تست‌های بیوشیمیایی ۱۵ سویه جداشده از خاک در جدول ۴ آمده‌اند.

بررسی شده ژن مرتبط با آنزیم ژلاتیناز تنها در ۳ سویه وجود نداشتند. نتیجه تست ژلاتیناز اکثر سویه‌ها ژلاتین مثبت بوده است.



شکل ۳: تست‌های افتراقی باکتری باسیلوس از چپ به راست عبارت‌اند

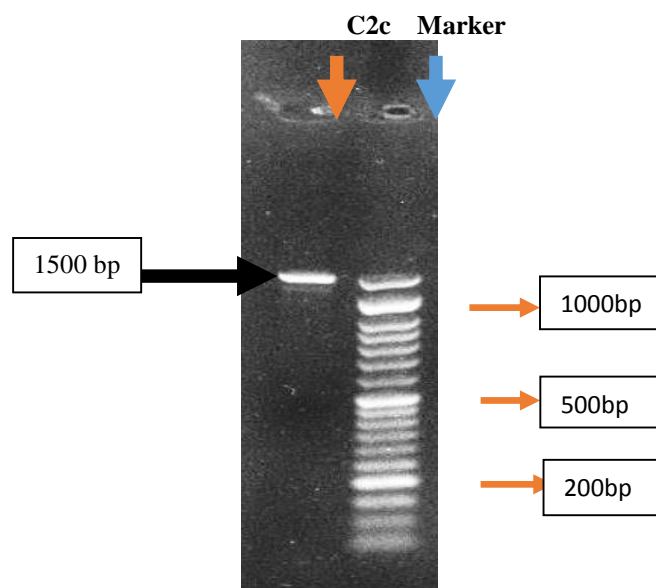
از لیستیناز، سیرتات، ژلاتیناز، حرکت، کاتالاز

Figure 3: Differential Tests for *Bacillus* Bacteria (From Left to Right: Lecithinase, Citrate, Gelatinase, Motility, Catalase).

جدول ۴: نتایج تست‌های بیوشیمیایی

Table 4: Results of Biochemical Tests

سویه	کاتالاز	سیرتات	ژلاتین	SIM حرکت	گلوکز	آرابینوز	مانیتول	گرایلوز	لیستیناز	بلاد آگار
E3b	+	+	-	+	+	+	+	+	+	A
C2e	+	-	+	-	+	-	-	+	+	**
F4b	+	-	+	-	+	-	+	-	+	B
D1g	+	-	-	-	+	-	-	-	+	**
D2b	+	+	+	+	+	+	+	-	+	Y
C2b	+	-	+	-	+	-	-	-	+	**
D3b	+	+	+	-	+	+	+	-	+	B
D2a	+	+	+	-	+	-	+	+	+	Y
B1c	+	-	-	+	+	+	+	+	+	**
E4a	+	+	+	-	+	+	+	-	+	B
A1d	+	+	+	-	+	+	+	-	+	A
C2c	+	+	+	+	+	+	+	-	+	Y
C2a	+	-	+	+	+	-	+	-	+	A
F2e	+	-	+	-	+	+	+	-	+	Y
A1c	+	+	+	-	+	+	+	-	+	B



شکل ۴: الکتروفورز نمونه‌های PCR
Figure 4: Electrophoresis of PCR Samples

Descriptions		Graphic Summary	Alignments	Taxonomy				
Sequences producing significant alignments								
Download Select columns Show 100								
select all 100 sequences selected								
GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer								
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Acc. Len	Accession
Bacillus subtilis strain CFR08 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus subtilis	1118	1118	100%	0.0	100.00%	883	MT641227.1
Bacillus halotolerans strain CFR06 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus halotole...	1118	1118	100%	0.0	100.00%	965	MT641225.1
Bacillus halotolerans strain KKD1 chromosome, complete genome	Bacillus halotole...	1118	11177	100%	0.0	100.00%	4248134	CP054584.1
Bacillus subtilis strain 18/IV 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus subtilis	1118	1118	100%	0.0	100.00%	1044	MT559805.1
Bacillus halotolerans strain HFBPR26 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus halotole...	1118	1118	100%	0.0	100.00%	1545	MT539148.1
Bacillus halotolerans strain MPF88 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus halotole...	1118	1118	100%	0.0	100.00%	1432	MT487706.1
Bacillus halotolerans strain MPF80 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus halotole...	1118	1118	100%	0.0	100.00%	1428	MT487705.1
Bacillus halotolerans strain MPF59 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus halotole...	1118	1118	100%	0.0	100.00%	1425	MT487691.1
Bacillus halotolerans strain MPF58 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus halotole...	1118	1118	100%	0.0	100.00%	1414	MT487690.1
Bacillus halotolerans strain MPF56 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus halotole...	1118	1118	100%	0.0	100.00%	1427	MT487689.1

شکل ۵: مشاهده هم‌ترازی توالی سویه C2c با استفاده از برنامه بیوانفورماتیکی BLAST در NCBI
Figure 5: Alignment of C2c Strain Sequence Using the Bioinformatics Program BLAST at NCBI

کیفیت و خلوص DNA برای ما بسیار اهمیت داشت، از کیت تجاری به جای روش جوشاندن استفاده شد (12).

۲. تکثیر ژن *16S rRNA*: با استفاده از پرایمرهای 5'-27F (1429R(5'-AGAGTTTGGATCMTGGCTCAG-3') و 3'-CGGTTACCTTGTTACGACTT-3') ژن *16S rRNA* تکثیر شد. نتایج حاصل از نواریابی تکثیر یافته در شکل ۴ آورده شده‌اند.

شناسایی سویه‌های باسیلوس براساس روش‌های مولکولی

نتایج شناسایی مولکولی سویه برتر

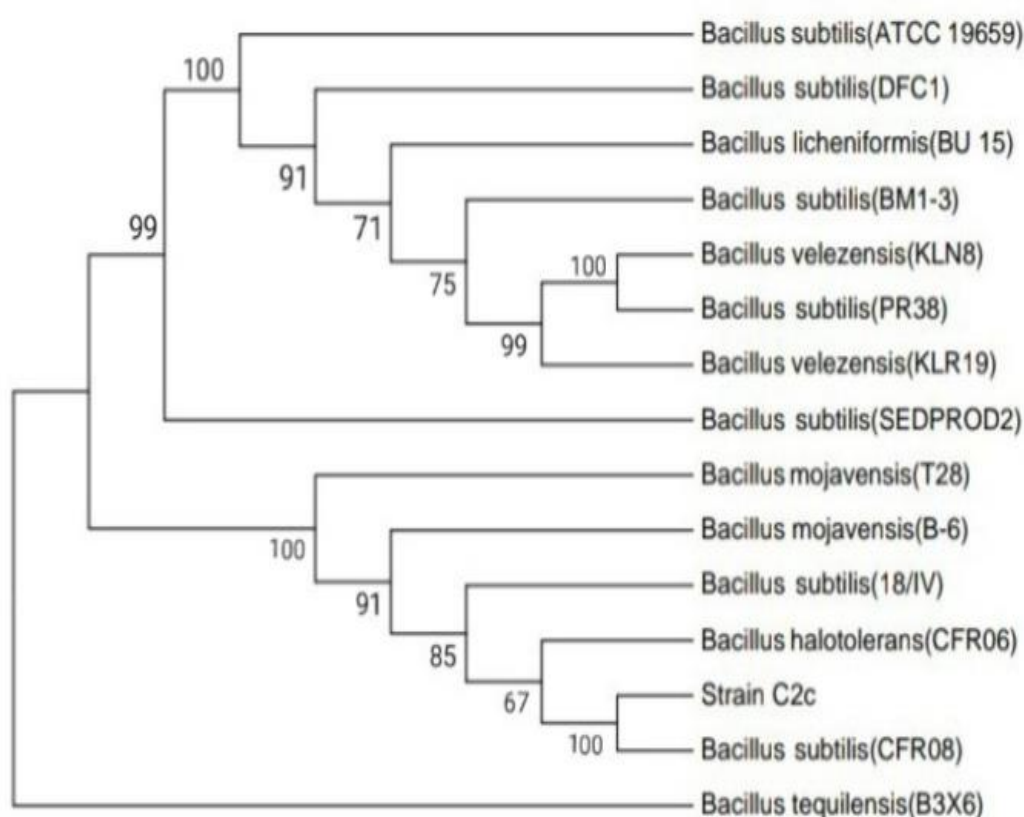
برای تأیید شناسایی بیوشیمیایی، شناسایی مولکولی و توالی‌یابی *16S rRNA* انجام شد.

۱. استخراج DNA: استخراج DNA از سویه جدا شده با استفاده از کیت خریداری شده از شرکت سیناکلون Catalog Number: EX6071 انجام شد. از آنجایی که در این پژوهش

رسم درخت فیلوژنتیکی

تجزیه و تحلیل توالی *16S rRNA* سویه C2c به منظور تعیین موقعیت فیلوژنی این باکتری در میان سایر باکتری‌ها در شکل ۶ نشان داد این سویه بیشترین قرابت ژنتیکی را با *Bacillus subtilis CFR08* دارد. مقادیر Bootstrap بالا در محل انشعاب شاخه‌های درخت نشان می‌دهد درخت تبارزایی مدنظر درجه اعتماد بالایی دارد.

۳. **توالی یابی:** نتایج توالی‌یابی، نشان‌دهنده تشابه ۱۰۰ درصد باکتری جداشده با *Bacillus subtilis* است و با توجه به نتایج حاصل از توالی‌یابی، سویه ما به طور دقیق با نام *Bacillus subtilis CFR08* معرفی شد (شکل ۵).



شکل ۶: تجزیه و تحلیل توالی *16S rRNA* جدایه C2c به منظور تعیین موقعیت فیلوژنی این باکتری در میان سایر باکتری‌ها در درخت فیلوژنتیکی سویه C2c با استفاده از نرم‌افزار Mega7

Figure 6: Analysis of 16S rRNA Sequence of C2c Isolate to Determine Phylogenetic Position of This Bacterium Among Other Bacteria in the Phylogenetic Tree of C2c Strain Using Mega7 Software

مطالعه‌شده در محیط بالا با مشاهده تغییرات کدورت و در زمان‌های مختلف بررسی شد و نتایج در جدول ۵ به شکل مثبت و منفی درج شدند. با توجه به مشاهده کدورت حاصل از رشد از بین ۱۵ جدایه ۱۱ سویه رشد در pHهای مختلف را داشتند و ۴ سویه به دلیل

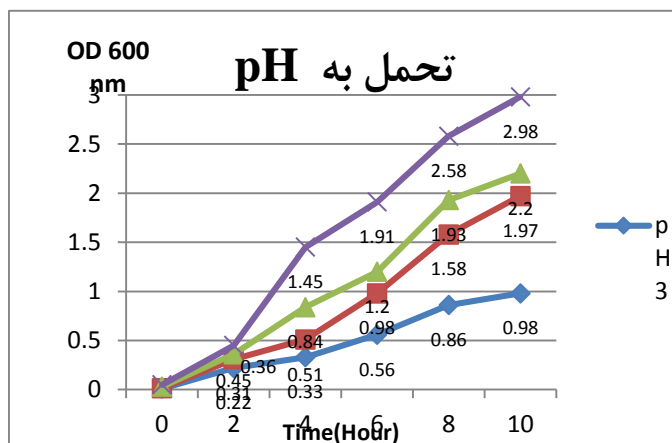
نتایج آزمون‌های پروبیوتیک

ارزیابی بقای سویه‌ها در محیط اسیدی و قلیایی

کدورت حاصل از رشد سویه‌ها در pHهای ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸ و ۹ بعد از ۲۴ ساعت قابل مشاهده بود. در pH ۲ هیچ کدورتی در محیط مشاهده نشد. گفتنی است توانایی رشد سویه‌های

۳ pH رشد باکتری به کندی صورت گرفت. طبق نتایج حاصل از نمودار ۱-۳ به نظر می‌رسد سویه مدنظر توانایی رشد در شرایط اسیدی را در زمان‌های مختلف دارد (جدول ۶ و نمودار ۱).

نداشتن توانایی رشد در شرایط اسیدی حذف شدند. منحنی رشد سویه برتر در زمان‌های مختلف توسط دستگاه اسپکتروفتومتر ترسیم شد. طبق نتایج به دست آمده، سویه C2c بهترین رشد را در ۴ pH در زمان‌های مختلف نشان داد و در



نمودار ۱: تحمل به pH اسیدی سویه C2c

Figure 1: Acidic pH Tolerance of C2c Strain

جدول ۵: رشد جدایه‌ها در شرایط اسیدی

Table 5: Growth of isolates in acidic conditions

جدایه	pH2	pH3	pH4	pH5	pH6	pH7	pH8	pH9
E3b	-	+	+	+	+	+	+	+
F4b	-	+	+	+	+	+	+	+
D2b	-	+	+	+	+	+	+	+
D3b	-	+	+	+	+	+	+	+
D2a	-	-	-	+	+	+	+	+
E4a	-	-	-	+	+	+	+	+
A1d	-	-	+	+	+	+	+	+
C2c	-	+	+	+	+	+	+	+
C2a	-	+	+	+	+	+	+	+
F2e	-	-	+	+	+	+	+	+
A1c	-	-	-	+	+	+	+	+

جدول ۶: نتایج اسپکتروفوتومتری سویه C2c در pH اسیدی

Table 6: Spectrophotometry Results of C2c Strain at Acidic pH

Time	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9
0	0.01	0.015	0.03	0.05	0.13	0.46	0.16
2	0.22	0.31	0.36	0.45	0.26	0.74	0.24
4	0.33	0.51	0.84	1.45	0.56	1.11	0.57
6	0.56	0.98	1.2	1.91	1.7	1.51	0.71
8	0.76	1.48	1.93	2.58	2.36	2.43	1.09
10	1.1	1.77	2.2	2.98	2.92	3.79	3.37
12	1.73	1.84	2.5	3.1	3.02	4.09	4.67
14	1.86	1.9	2.81	3.05	3.27	4.66	5.21
24	1.87	1.98	2.96	3.22	3.93	5.4	5.57

جدول ۷: نتایج حاصل از آنتی‌بیوگرام

Table 7: Results of Antibiogram

V			LEV			CAZ			CH			TE			C			S			GM			آنتی‌بیوتیک				
S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	بازه حساسیت	تا مقاومت			
20≤	15-	≤14	20≤	15-	≤14	20≤	15-	≤14	20≤	15-	≤14	20≤	15-	≤14	20≤	15-	≤14	20≤	15-	≤14	20≤	15-	≤14	20≤	15-	≤14	سویه	ردیف
			36			-			29			35			25			13			26			E3b	-1			
			27			-			20			20			20			15			22			C2e	-2			
			35			-			27			30			23			13			25			F4b	-3			
			26			-			19			21			20			15			22			D1g	-4			
			34			-			25			27			25			13			23			D2b	-5			
			25			-			20			20			17			11			22			C2b	-6			
			34			-			25			30			22			14			27			D3b	-7			
			30			-			27			35			25			15			27			D2a	-8			
			37			-			13			26			12			14			26			B1c	-9			
			28			15			27			35			23			14			30			E4a	-10			
			36			-			25			32			23			15			26			A1d	-11			
			30			17			27			37			27			15			25			C2c	-12			
			37			-			17			35			27			15			26			C2a	-13			
			38			-			25			35			28			14			28			F2e	-14			
			28			15			25			35			20			15			20			A1c	-15			

آنتی‌بیوتیک سفنازیدیم مقاوم بودند؛ به طوری که هاله‌ای در اطراف دیسک آنتی‌بیوتیکی مشاهده نشد. نتایج حاصل از آنتی‌بیوگرام در جدول ۷ آمده‌اند.

نتایج آنتی‌بیوگرام

تمام ۱۱ سویه حساسیت خود را به آنتی‌بیوتیک‌های ذکر شده به صورت هاله‌ای اطراف دیسک به نمایش گذاشتند (شکل ۷). شایان ذکر است تمام باکتری‌ها به جز سویه C2c در برابر

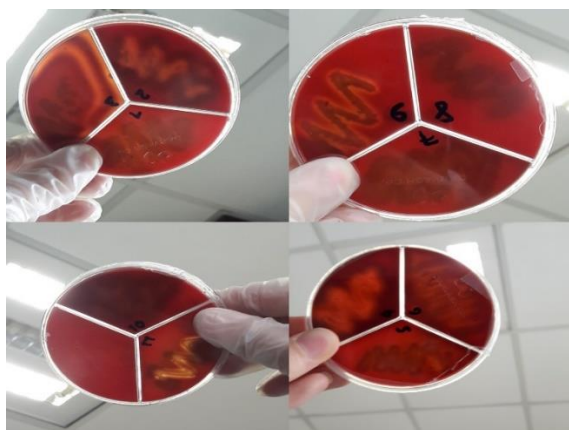
مطالعه‌شده، ۳ سویه α همولیتیک و ۴ سویه β همولیتیک بودند؛ درنهایت، ۴ سویه خالص همولیز منفی (γ همولیتیک) باقی ماندند که مطالعات روی آنها صورت گرفت.

جدول ۸: نتایج اسپکتروفتومتری سویه C2c در غلظت‌های مختلف

نمک سدیم کلرید

Table 8: Spectrophotometry Results of C2c Strain at Different Concentrations of Sodium Chloride

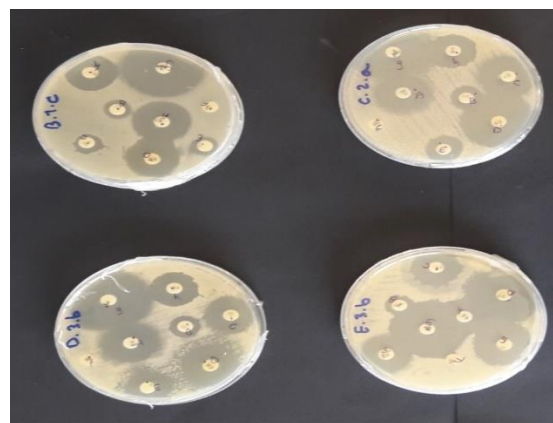
Time	NACL%2	%4	%6	%8	%10
0	0.018	0.095	0.090	0.113	0.116
2	0.111	0.031	0.162	0.162	0.128
4	0.123	0.049	0.178	0.167	0.134
6	0.131	0.053	0.212	0.171	0.135
8	0.133	0.064	0.217	0.291	0.135
24	0.157	0.317	0.219	0.321	0.166
26	0.214	0.376	0.309	0.391	0.620
48	0.312	0.378	0.497	0.412	0.830



شکل ۸: نتایج تست فعالیت همولیتیک
Figure 8: Results of Hemolytic Activity Test

نتایج تست مقاومت به نمک صفراوی

طبق پروتکل شماره ۱۹۴۵۹ استاندارد ملی ایران، برای تعیین میزان مقاومت به صفرا در باکتری‌ها معمولاً از غلظت‌های نزدیک به شرایط بدن انسان (غلظت ۰/۳) استفاده می‌شود. ۴ سویه قادر به رشد در ۰/۳ درصد نمک صفرا در زمان‌های ۰، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۲۴ ساعت بودند. پس از گذشت ۵ ساعت تنها ۲ سویه بیشترین میزان رشد را در غلظت ۰/۳ درصد نمک



شکل ۷: نتایج تست آنتی‌بیوگرام
Figure 7: Results of Antibiogram Test

توانایی رشد باسیلوس‌ها در دما و غلظت‌های مختلف نمک سدیم کلرید

سویه‌های آزمایش‌شده توانست دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد را به مدت ۲۰ دقیقه تحمل کند و تعداد باکتری‌های زنده پس از پورپلیت برابر یا بیشتر از 10^5 تخمین زده شد.

در ادامه رشد ۱۱ سویه منتخبی که مقاومت و بقای قابل قبولی در شرایط اسیدی داشتند، در غلظت‌های نمک سدیم کلرید ارزیابی شدند. در بین ۱۱ سویه رشد قابل قبولی در غلظت‌های ذکر شده از نمک سدیم کلرید مشاهده شد؛ به طوری که در غلظت ۲ درصد، کدورت حاصل از رشد بسیار زیاد بود. رشد تعدادی از باکتری‌ها در غلظت ۸ درصد کاهش یافت؛ اما سویه C2c در تمام غلظت‌های نمک سدیم کلرید رشد چشمگیری داشت. بدین منظور رشد سویه C2c در زمان‌های مختلف توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد و نتایج در جدول ۸ ثبت شدند.

نتایج فعالیت همولیتیک

مشاهده یک منطقه سبز اطراف کلنی را هیدرولیز جزئی (آلفا همولیز) و هیدرولیز کامل توسط یک منطقه شفاف را بتا همولیز می‌گویند و در صورت نبود واکنش اطراف کلنی گاما همولیز گزارش می‌شود (شکل ۸). سویه‌های باسیلوس با خواص پروبیوتیکی همولیز منفی بودند. از بین ۱۱ سویه

اطراف چاهک‌ها ایجاد کرده است.

جدول ۹: نتایج اسپکتروفوتومتری سویه C2c در غلظت ۰/۳ درصد نمک صفراوی

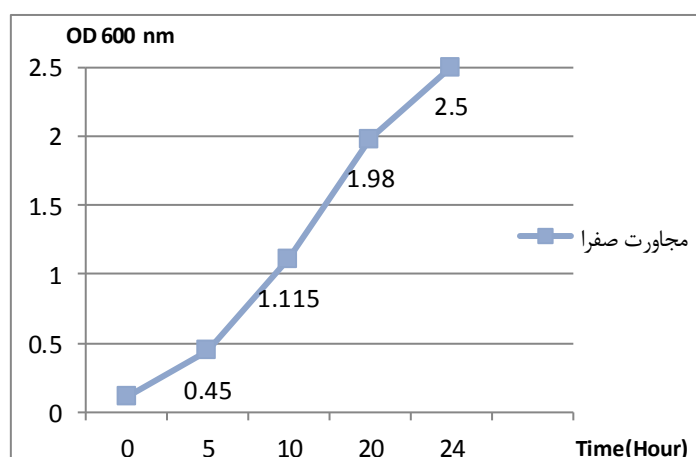
Table 9: Spectrophotometry Results of C2c Strain at 0.3% Bile Salt Concentration

Time	نمک صفراوی ۰/۳٪
0	0/11
5	0/45
10	1/115
20	1/98
24	2/5

صفرا از خود نشان دادند. نتایج مربوط به رشد باکتری در حضور ۰/۳ درصد نمک صفراوی در جدول ۹ نشان دادند از بین ۴ سویه، C2c توانایی رشد بیشتری در حضور این نمک دارد (نمودار ۲).

نتایج فعالیت ضد میکروبی

در بررسی فعالیت ضد میکروبی مشخص شد سویه C2c علیه پاتوژن‌های سالمونلا و اشرشیا کلی و استاف اورئوس، اثر ضد میکروبی بهتری از خود نشان داده و هاله‌های شفافیتی در



نمودار ۲: منحنی رشد سویه C2c را در محیط حاوی اکس گال (نمک صفراوی) در زمان‌های متفاوت نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود سویه C2c محیط حاوی نمک صفراوی را در زمان‌های مختلف تحمل کرده و در شرایط صفراوی رشد قابل قبولی داشته است.

Figure 2: The growth curve of strain C2c in a medium containing X-gal (bile salt) at different time points is shown. As observed, strain C2c tolerated the bile salt-containing medium over various time intervals and exhibited acceptable growth under bile conditions.

مقاوم هستند. همچنین، احتمال بیشتری برای زنده ماندن در دستگاه گوارش فوقانی و رسیدن به روده بزرگ دارند. به باکتری‌های پروبیوتیک تشکیل‌دهنده اسپور از لحاظ علمی و تجاری توجه گسترده‌ای شده است. در میان آنها گونه‌های باسیلوس بیشترین مطالعه را به‌عنوان باکتری‌های گرم مثبت دارند. استفاده از باسیلوس به‌عنوان محصولات پروبیوتیک به‌خصوص به‌دلیل توانایی ذاتی آنها در تشکیل اندوسپورها با بقا و تحمل در محیط و تولید تعداد زیادی متابولیت با ارزش با توانایی درمانی زیستی و تحریک ایمنی همراه است. در این پژوهش علاوه بر آزمایش‌های مورفولوژی و بیوشیمیایی برای

بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به کاربردهای محصولات پروبیوتیک در پیشگیری و درمان بیماری‌ها، پروبیوتیک‌های مبتنی بر خاک به‌دلیل استحکام، ماندگاری طولانی و توانایی بهبود هضم، تحریک سیستم ایمنی و کمک به حفظ میکروبیوتای روده سالم درخور توجه قرار گرفته‌اند. Soil-based organism (SBO) ارگانیزم مبتنی بر خاک بیش از ۱۰۰ گونه مختلف از میکروب‌ها را شامل می‌شود که به‌طور طبیعی در خاک یافت می‌شوند. بیشتر SBOهای استفاده‌شده در پروبیوتیک‌های مبتنی بر خاک اسپورساز هستند. SBOها در برابر گرما و اسید

شناسایی جنس باسیلوس، تست لیستیناز نیز در دستور کار قرار گرفت. هدف از انجام تست لیستیناز در این پژوهش افتراق بین گونه‌های خاص در جنس باسیلوس بود. سویه‌های باسیلوس جداسازی شده همگی لیستیناز مثبت بودند و از آنجایی که وجود فعالیت لیستیناز در برخی باکتری‌های پروبیوتیک ممکن است ابتدا به‌عنوان یک ویژگی پاتوژنیک در نظر گرفته شود، با این حال، این ویژگی همیشه به معنای بیماری‌زایی نیست (13).

نقش لیستیناز در مکانیسم رقابت زیستی و فعالیت‌های مختلف این آنزیم در روده شامل پردازش لیپیدها و تنظیم متابولیسم در باکتری‌های پروبیوتیک نباید نادیده گرفته شود. به عبارتی دیگر، عملکرد لیستیناز در پروبیوتیک‌ها بیشتر به‌عنوان یک ویژگی تنظیمی یا رقابتی در نظر گرفته شود و نه لزوماً نشانه‌ای از پاتوژنیسیته (14)؛ با وجود این، انجام آزمایش‌های برون‌تن و لزوم ارزیابی بیشتر سویه‌ها از نظر فاکتورهای پاتوژنی مانند تولید توکسین و سایر فاکتورهای ویروالانس، برای ارائه ارزیابی دقیق‌تر ضروری است.

میکروارگانیزم‌های پروبیوتیک اسیدهای معده و صفراوی را تحمل می‌کنند و همچنین در برابر آنزیم‌های گوارشی مقاوم‌اند. Islam, V.H در سال ۲۰۱۱، روی باسیلوس آمیلولیکویی فانشینز در خاک‌های شمال شرقی هیمالیا به‌عنوان یک پروبیوتیک آزمایش کرد. در این مطالعه ۴ سویه در مقابل اسید و نمک صفراوی ۰/۴۴ درصد مقاومت نشان دادند. هدف از این آزمایش ارزیابی خواص پروبیوتیک باکتری باسیلوس آمیلولیکویی فانشینز در خاک هیمالیا بود (15)؛ اما در این پژوهش ما خواص پروبیوتیکی باسیلوس سوبتیلیس را بررسی کردیم که از نظر گونه با مطالعه Islam, V.H متفاوت بود. کرمی و همکارانش در سال ۱۳۹۰، ۱۴۰ ایزوله باسیلوس را از فضولات تازه از ۸ مرغداری اراک جدا کردند تا خصوصیات پروبیوتیکی ایزوله‌ها شامل مقاومت به اسید و صفرا و پپسین و تولید ترکیبات ضد میکروبی را بررسی کنند. نتایج نشان داده‌اند نیمی از ایزوله‌ها توانایی رشد در

نمک سدیم کلرید ۱۰ درصد را داشتند و سویه شماره ۸ آن به اسید کلریدریک، مقاوم و سویه شماره ۵ نیز ۱۰۰ درصد به نمک‌های صفراوی مقاوم بوده است. همچنین، تمامی سویه‌ها دارای فعالیت ضد میکروبی علیه پاتوژن‌های معمول مانند ایکولای و سالمونلا بودند (16). در این پژوهش نیز خصوصیات پروبیوتیکی باسیلوس‌ها طبق تست‌های پروبیوتیکی مشابه تحقیق کرمی و همکارانش انجام شد و نتایج حاصل با نتایج آنها مطابقت داشتند؛ فقط تفاوت در محیط جداسازی بوده است که باسیلوس سوبتیلیس در مطالعه حاضر از خاک جداسازی شد، اما در تحقیق کرمی و همکارانش باسیلوس از فضولات تازه از مرغداری اراک جداسازی شده است. همچنین در مطالعه Ammar Algburi و همکارانش در سال ۲۰۱۶، ایمنی و خواص پروبیوتیک باسیلوس آمیلولیکویی فانشینز B-1895 و باسیلوس سوبتیلیس KATMIRA1933 بررسی شدند. اندوسپورهای باسیلوس آمیلولیکویی فانشینز و باسیلوس سوبتیلیس به غلظت ۰/۳ درصد از نمک‌های صفراوی و ۳-pH-۲-pH به مدت ۴ ساعت مقاوم بودند؛ این نتایج با نتایج حاصل از پژوهش ما مطابقت داشتند (17). براساس مطالعه Xiaohua Guo و همکارانش، سویه باسیلوس سوبتیلیس MA139 مقاومت کامل به ۲-pH و نمک‌های صفراوی با غلظت ۰/۳ درصد را داشته است. همچنین، بالاترین فعالیت ضد میکروبی را در برابر اشرشیا کلی و سالمونلا و استافیلوکوکوس اورئوس نشان داده است (18). نتایج ما نیز در پژوهش حاضر حاکی از این بود که باسیلوس سوبتیلیس جداسازی شده می‌تواند به‌عنوان پروبیوتیک استفاده شود. با این تفاوت که باسیلوس سوبتیلیس جداسازی شده در این پژوهش قابلیت زنده ماندن در ۲-pH را نداشت. در مطالعه دیگری که Kristoffersen و همکارانش انجام دادند، میزان رشد ۴۰ سویه باسیلوس در برابر غلظت‌های ۰/۰۵ تا ۰/۲ نمک صفرا آزمایش شد. نتایج نشان می‌دهند سویه‌های باسیلوس سرئوس و باسیلوس مگاتریوم، فقط قادر به تحمل میزان ۰/۰۵ نمک صفرا بوده‌اند؛ در حالی که در این

نمونه فاقد فعالیت همولیتیکی بودند. مطالعه Mohkam نشان داده است برخی از گونه‌های باسیلوس به‌ویژه گروه‌های سوبتیلیس و پومیلوس توالی‌های ژن *16S rRNA* مشابهی دارند که شناسایی آنها براساس تجزیه و تحلیل *16S rRNA* سخت است. برای رفع این اشکال تجزیه و تحلیل توالی *recA* و *rpoB* همراه با انگشت‌نگاری چندشکلی (RAPD PCR) به‌عنوان یک روش جایگزین برای تمایز گونه‌های باسیلوس درخور توجه قرار گرفت (22,23). در این مطالعه نیز تجزیه و تحلیل ژن *16S rRNA* به روش PCR به‌عنوان روش شناسایی مولکولی انتخاب شد.

در مطالعه حاضر وجود باکتری‌های مختلف باسیلوس از نواحی مختلف پارک جنگلی یاس فاطمی و کاربرد احتمالی آن به‌عنوان پروبیوتیک نشان داده شد. سویه باسیلوس جداسازی‌شده از این نواحی، به‌دلیل تحمل بالایی که به شرایط اسیدی و نمک صفرای، به‌عنوان مهم‌ترین ویژگی باکتری‌های پروبیوتیک داشت و همچنین مقاومت به برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها و فعالیت ضدباکتریایی آن علیه پاتوژن‌های *Staphylococcus aureus* با نام *Bacillus subtilis CFR08* به‌عنوان یک پروبیوتیک بالقوه شناسایی شد؛ اما در نهایت با توجه به اینکه در این پژوهش آزمایش‌های لازم روی حیوان آزمایشگاهی برای بررسی توانایی باکتری به چسبندگی به سلول‌های اپی‌تلیال و ارزیابی هیدروفوبیسیته آن انجام نگرفت، پیشنهاد می‌شود تحقیقات بیشتری شامل آزمایش‌های *in-vivo* و بررسی‌های مولکولی انجام گیرد تا پتانسیل کامل این سویه از لحاظ ایمنی و کارایی آن در بهبود سلامت موجودات زنده و کاربرد آن به‌عنوان یک پروبیوتیک بالفعل اثبات شود.

References

- (1) Hosseini E, Siasi F, Babaei H. Isolation and identification of riboflavin producer from the soil of different regions of Iran. *New Journal of Cellular and Molecular Biotechnology*. 2017;8(32):81-90. <http://ncmbjpiu.ir/article-1-1140-fa.html> [In Persian].

مطالعه سویه باسیلوس سوبتیلیس قادر به تحمل میزان ۰/۳ درصد نمک صفر است (19). در مطالعه Aslim و همکارانش در سال ۲۰۰۲، گزارش شد سویه‌های باسیلوس سوبتیلیس، باسیلوس مگاتریوم و باسیلوس تورنجسیس در برابر پاتوژن‌های اشرشیا کلی و یرسینیا انتروکولیتیکا اثر ضد میکروبی از خود نشان دادند و در برابر این پاتوژن‌ها مقاوم بودند. نتایج ما نیز در این پژوهش حاکی از مقاومت باسیلوس سوبتیلیس در برابر پاتوژن‌های اشرشیا کلی، سالمونلا و استافیلوکوکوس اورئوس بوده است. همچنین، Galarza-Seeber تأثیر ۱۲ نوع آنتی‌بیوتیک را بر دو سویه باسیلوس سوبتیلیس و باسیلوس مگاتریوم بررسی کرد. نتایج این بررسی نشان داده‌اند این دو سویه نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های نوویوسین، سفتیوفور، کلیندامایسین، اریترومایسین و باسیتراسین، مقاوم و نسبت به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها (اسپتینومایسین، تریپل سولفات، تتراسایکلین، ارموتوپریم، پنی‌سیلین، نئومایسین و جنتامایسین) حساس بودند (20). در مطالعه حاضر نیز باسیلوس سوبتیلیس نسبت به کلیندامایسین، تتراسایکلین و جنتامایسین حساس بود. مطالعه‌ای در سال ۱۹۹۴ توسط Beecher و Wong به‌منظور بررسی فعالیت همولیتیک انجام شد. آنها نشان دادند ۳۶ درصد سویه‌ها فاقد فعالیت همولیتیک و ۶۴ درصد آنها الگوی ناپیوسته‌ای از فعالیت همولیتیک از خود نشان داده‌اند که پس از بررسی حضور یا عدم حضور ژن‌های همولیتیک، تمامی سویه‌ها فاقد این ژن بودند. حضور یک الگوی ناپیوسته همولیتیک معمولاً مرتبط با حضور BL در باسیلوس است (21)؛ اما در مطالعه حاضر، ۷ سویه دارای فعالیت همولیتیک به‌صورت آلفا و بتا بودند و از آنجایی که یکی از معیارهای مهم پروبیوتیک ایدئال، نداشتن فعالیت همولیتیکی است، در این مطالعه ۴

- (2) Elshagabee FM, Rokana N, Gulhane RD, Sharma C, Panwar H. *Bacillus* as potential probiotics: status, concerns, and future perspectives. *Front Microbiol*. 2017;8:1490. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01490>
- (3) Amin M, Rakhisi Z, Zarei AA. Isolation and identification of *Bacillus* species from soil

- and evaluation of their antibacterial properties. *Avicenna J Clin Microbiol Infect*. 2015;2(1):e23233.
<https://doi.org/10.17795/ajcmi-23233>
- (4) Fooks L, Gibson GR. Probiotics as modulators of the gut flora. *Br J Nutr*. 2002;88(S1):S39-S49.
<https://doi.org/10.1079/BJN2002628>
- (5) EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP). Guidance on the assessment of the toxigenic potential of *Bacillus* species used in animal nutrition. *EFSA J*. 2014;12(5):3665.
<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3665>
- (6) Jeżewska-Fraćkowiak J, Seroczyńska K, Bieganski A, Górska S, Koralewski R, Struk M. The promises and risks of probiotic *Bacillus* species. *Acta Biochim Pol*. 2018;65(4):509-519.
https://doi.org/10.18388/abp.2018_2652
- (7) Elisashvili V, Kachlishvili E, Chikindas ML. Recent advances in the physiology of spore formation for *Bacillus* probiotic production. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2019;11(3):731-747.
<https://doi.org/10.1007/s12602-018-9492-x>
- (8) Makharia GK, Choudhury S, Jayanthi V, et al. A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial of a Probiotic Preparation, VSL#3, for the Treatment of Mild to Moderate Active Ulcerative Colitis. *Gastroenterology*. 2008;134(4):A99.
[https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(08\)60463-1](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(08)60463-1)
- (9) Kyriakis SC, Tsioloyiannis VK, Vlemmas J, et al. The effect of probiotic LSP 122 on the control of post-weaning diarrhoea syndrome of piglets. *Res Vet Sci*. 1999;67(3):223-228.
<https://doi.org/10.1053/rvsc.1999.0308>
- (10) Fijan S. Microorganisms with claimed probiotic properties: an overview of recent literature. *Int J Environ Res Public Health*. 2014;11(5):4745-4767.
<https://doi.org/10.3390/ijerph110504745>
- (11) Algarni AA. Combining of molecular 16S rRNA gene and metabolic fingerprinting through biolog system for the identification of streptomycetes in Saudi Arabia. *J King Saud Univ Sci*. 2022;34(3):101889.
<https://doi.org/10.1016/j.jksus.2022.101889>
- (12) Dimitrakopoulou ME, Kalogiannis S, Gousia P, et al. Boiling extraction method vs commercial kits for bacterial DNA isolation from food samples. *J Food Sci Nutr Res*. 2020;3(4):311-319.
<https://doi.org/10.26502/jfsnr.2642-11000057>
- (13) Fontana L, Bermudez-Brito M, Plaza-Diaz J, Munoz-Quezada S, Gil A. Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics. *Br J Nutr*. 2013;109(S2):S35-S50.
<https://doi.org/10.1017/S0007114512004011>
- (14) Yi R, Zhang C, Ye Y, et al. Enzyme producing activity of probiotics and preparation of compound enzyme. *J Chem*. 2020;2020(1):9140281.
<https://doi.org/10.1155/2020/9140281>
- (15) Islam VH, Sarma S, Sharma R, et al. Isolation and characterization of putative probiotic bacterial strain, *Bacillus amyloliquefaciens*, from North East Himalayan soil based on in vitro and in vivo functional properties. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2011;3(3):175-185.
<https://doi.org/10.1007/s12602-011-9081-8>
- (16) Karami M, Jafari P, Mozaffari N. Isolation and determination of probiotic properties of *Bacillus* strains isolated from poultry farms in Arak city. *Microbial Biotechnology Journal*. 2011;3(11):7-14.
<https://civilica.com/doc/168912/> [In Persian].
- (17) AlGhuri A, Volski A, Cawthorn L, et al. Safety properties and probiotic potential of *Bacillus subtilis* KATMIRA1933 and *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895. *Adv Microbiol*. 2016;6(6):432-452.
<https://doi.org/10.4236/aim.2016.66043>
- (18) Guo X, Li D, Lu W, Piao X, Chen X. Screening of *Bacillus* strains as potential probiotics and subsequent confirmation of the in vivo effectiveness of *Bacillus subtilis* MA139 in pigs. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2006;90(2):139-146.
<https://doi.org/10.1007/s10482-006-9067-9>
- (19) Kristoffersen SM, Ravnum S, Tourasse NJ, Økstad OA, Kolstø AB, Davies W. Low concentrations of bile salts induce stress responses and reduce motility in *Bacillus cereus* ATCC 14570. *J Bacteriol*. 2007;189(14):5302-5313.
<https://doi.org/10.1128/jb.00239-07>

- (20) Aslim B, Sağlam N, Beyatli Y. Determination of some properties of *Bacillus* isolated from soil. *Turk J Biol.* 2002;26(1):41-48. <https://doi.org/10.1007/s10482-006-9067-9>
- (21) Galarza-Seeber R, Fernandez-Alarcon MF, Daher RK, et al. Isolation, screening and identification of *Bacillus* spp. as direct-fed microbial candidates for aflatoxin B1 biodegradation. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2015;5(9):702-706. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.07.014>
- (22) Beecher DJ, Wong A. Identification of hemolysin BL-producing *Bacillus cereus* isolates by a discontinuous hemolytic pattern in blood agar. *Appl Environ Microbiol.* 1994;60(5):1646-1651. <https://doi.org/10.1128/aem.60.5.1646-1651.1994>
- (23) Mohkam M, Nezafat N, Berenjian A, Ghasemi Y. Identification of *Bacillus* probiotics isolated from soil rhizosphere using 16S rRNA, recA, rpoB gene sequencing and RAPD-PCR. *Probiotics Antimicrob Proteins.* 2016;8(1):8-18. <https://doi.org/10.1007/s12602-016-9208-z>