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

Journal of Microbial Biology
E-ISSN: 3060-7647
14rd Year, Vol. 14, No. 53, Spring 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 Sepahy[1]
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

This is an open access article under the CC BY-NC-ND/4.0/ License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).
Gohari heydari S, akhavanesepahy A, Mehrabian S. Isolation of Different Bacillus Species from the Soil of Yas Fatemi Forest Park and Investigation of Their Probiotic Properties. Journal of Microbial Biology. 2025; 14(53): 49-70. doi: 10.22108/bjm.2024.143024.1617

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*

doi: 10.22108/bjm.2024.143024.1617

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.

doi: 10.22108/bjm.2024.143024.1617

زیست‌شناسی میکروبی
سال چهاردهم، شماره ۵۳، بهار ۱۴۰۴، صفحه ۴۹-۷۰
تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۷/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۰/۰۵
مقاله پژوهشی

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.com
عباس اخوان سپهی *
گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران
akhavansepahy@gmail.com
صدیقه مهرابیان
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 ازجمله باکتری‌ها است. پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده و مفید هستند که در صورت مصرف منظم، می‌توانند سلامت عمومی را بهبود بخشند. باکتری‌های پروبیوتیک، به‌دلیل 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، سیترات، 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، تست های مربوط به خواص پروبیوتیکی روی سویه‌ها انجام شدند. همچنین سویه‌ها ازنظر فعالیت همولیتیک و فعالیت ضدمیکروبی در برابر باکتری‌های *Escherichia coli*، *Salmonella* و *Staphylococcus aureus* 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 ضدمیکروبی مناسبی علیه سویه‌های پاتوژن آزمایش‌شده نشان داد؛ درنهایت، این باکتری با به‌کارگیری روش‌های شناسایی بیوشیمیایی و توالی‌یابی *16S rRNA* به‌عنوان *Bacillus subtilis CFR08* 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 مصرف‌کنندهٔ باکتری‌های پروبیوتیک استفاده شود.

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

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات

گوهری حیدری صدیقه، اخوان سپهی عباس، مهرابیان صدیقه. جداسازی انواع باسیلوس ها از خاک پارک جنگلی یاس فاطمی وبررسی خواص پروبیوتیکی آنها. *زیست شناسی میکروبی*. ۱۴۰۴؛ ۱۴(۵۳): ۴۹-۷۰. doi: 10.22108/bjm.2024.143024.1617

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 ازجمله 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 نشان‌دهندهٔ 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* تشکیل‌دهندهٔ 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؛ ازجمله 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 کلونیزه‌شدن در دستگاه گوارش انسان را دارند (2,3).

تجزیه و تحلیل تمام سویه‌های پروبیوتیک از *Bacillus* و *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. متمایزکردن 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 زنده‌ماندن 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

doi: 10.22108/bjm.2024.143024.1617

هنوز می‌تواند در شرایط هوازی تشکیل اسپور دهد (6).

اسپوراسیون *Bacillus* علاوه بر اینکه می‌تواند با تمام‌شدن مواد مغذی القا شود، با قراردادن سلول‌ها در بعضی شرایط نامساعد محیطی دیگر ازجمله افراطی‌بودن 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 ضدمیکروبی 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 ویرولانسی هستند که عامل اصلی بیماری‌اند؛ بنابراین، باید قبل از استفاده به‌عنوان پروبیوتیک ازنظر ایمنی بررسی شوند (8,9).

سویه‌های خاص *Bacillus* با خواص پروبیوتیک

جنس *Bacillus* شامل اعضای گرم مثبت اسپورساز هوازی یا هوازی اختیاری است. سویه‌های با خواص پروبیوتیک ادعاشده 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 نمونه‌برداری‌شده نیز یادداشت شد که در جدول ۱ آورده شده‌اند.

جدول ۱: برخی پارامترهای نمونه‌های خاک و ویژگی نقاط نمونه‌برداری‌شده

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

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

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 به‌منظور 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 هوازی انکوبه شدند.

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

doi: 10.22108/bjm.2024.143024.1617

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 به‌منظور 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. به‌منظور 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 مثبت‌بودن آزمایش، حباب‌های گاز اکسیژن بلافاصله مشاهده می‌شود.

فعالیت همولیتیک

تست همولیتیک سویه‌های باکتریایی به‌صورت کشت خطی (زیگزاک) روی محیط بلادآگار (محیط پایه حاوی ۵ درصد خون گوسفندی دفیبرینه) انجام شد و بعد به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سویه‌های 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 ذکرشده هربار یک قند به میزان ۰/۵ درصد اضافه شد؛ البته محیط پایه به‌صورت جداگانه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو شد و بعد از خنک‌شدن، هر یک از قندها با فیلتر سرنگی برای استریل‌شدن 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 سانتی‌گراد به مدت ۴۸-۲۴ ساعت انکوبه شدند؛ درنهایت، 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 نشان‌دهندهٔ مثبت‌بودن واکنش است.

آزمون اندول و حرکت

هدف از این آزمون، بررسی توانایی باکتری‌ها در تجزیه اسیدآمینه تریپتوفان توسط آنزیم تریپتوفاناز و بررسی وضعیت حرکت باکتری است. در این آزمون از محیط نیمه‌جامد (سولفور.ایندول.موتیلیتی) استفاده شده است. باکتری به‌صورت کشت عمقی در محیط، تلقیح و بعد از گرماگذاری برای بررسی نتیجه، روی محیط کشت معرف کواکس اضافه شد. در صورت مثبت‌بودن تست اندول حلقهٔ 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 به‌منظور بررسی توانایی عده‌ای از میکروارگانیسم‌ها در هیدرولیز یا ذوب ژلاتین استفاده می‌شود. برای بررسی هیدرولیز ژلاتین از محیط نوترینت براث 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 سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد 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 به‌علت 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.

doi: 10.22108/bjm.2024.143024.1617

آزمون سیترات

این آزمون به‌منظور شناسایی میکروارگانیسم‌هایی به کار می‌رود که از سیترات به‌عنوان تنها منبع کربن استفاده می‌کنند. برای انجام این آزمون از محیط افتراقی سیمون سیترات آگار استفاده می‌شود. این محیط شامل سیترات سدیم به‌عنوان تنها منبع کربن محیط، املاح آمونیوم به‌عنوان 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 استرلیزاسیون، لوله‌های حاوی محیط به‌صورت مورب قرار داده شدند تا محیط سفت شود و سپس باکتری به‌صورت عمقی و در ادامه روی سطح مورب کشت داده شد. سپس محیط به مدت ۴۸-۲۴ در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شده است. اگر باکتری قادر به استفاده از محیط باشد، رنگ محیط به‌دلیل قلیایی‌شدن 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 زردهٔ 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 ۴۸-۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شده است. در صورت مثبت‌بودن 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. به‌منظور 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 $1/5*10^8$ ml Cfu/) به مدت ۲۴ ساعت

۲- اضافه‌کردن ۴۰۰ میکرولیتر Lysis buffer و ورتکس با بیشترین سرعت به مدت ۲۰ ثانیه

۳- اضافه‌کردن ۳۰۰ میکرولیتر محلول precipitation و ورتکس با بیشترین سرعت به مدت ۵ ثانیه

۴- انتقال محلول به ستون و جمع‌آوری به‌وسیله پیپت

۵- سانتریفیوژ تیوپ با دور g-force ۱۳۰۰۰ به مدت ۱ دقیقه

۶- انتقال به تیوپ جمع‌آوری جدید و اضافه‌کردن ۴۰۰ میکرولیتر wash buffer I و سانتریفیوژ با دور g-force ۱۳۰۰۰ به مدت ۱ دقیقه

۷- شست‌وشوی ستون با ۴۰۰ میکرولیتر wash buffer II و سانتریفیوژ با دور g-force ۱۳۰۰۰ به مدت ۱ دقیقه

۸- شست‌وشوی ستون با ۴۰۰ میکرولیتر wash buffer II و سانتریفیوژ با دور g-force ۱۳۰۰۰ به مدت ۱ دقیقه

۹- قراردادن ستون در تیوب جمع‌آوری و سانتریفیوژ با دور g-force ۱۳۰۰۰ به مدت ۱ دقیقه

۱۰- اطمینان از انتقال ستون به تیوب ۱/۵ میلی‌لیتر جدید و اضافه‌کردن ۳۰ میکرولیتر elution buffer گرم‌شده تا دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد، انکوبه‌کردن به مدت ۵-۳ دقیقه در ۶۵ درجه سانتی‌گراد و سانتریفیوژ با دور g-force ۱۳۰۰۰ به مدت ۱ دقیقه.

doi: 10.22108/bjm.2024.143024.1617

الکتروفورز نمونه‌های DNA

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

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

به‌منظور تکثیر قطعه ژنی در ناحیه *16S rRNA* سویه‌های برتر، با استفاده از دو پرایمر 27F و 1429R، DNA استخراج‌شده از باکتری به‌عنوان DNA الگو در دستگاه ترموسایکلر قرار گرفت. تکنیک PCR در ۳۰ دور و با برنامه ذکرشده در جدول ۲ انجام شده است. گفتنی است ترکیبات مخلوط واکنش برای PCR در جدول ۳ در ضمیمه آمده‌اند.

جدول ۲: برنامه PCR

Table 2: PCR Program

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	۱λ
پرایمر F	۱ λ
پرایمر R	۱ λ
مسترمیکس (آنزیم Taq، بافر آنزیم، $Mgcl_2$، DNTP)	۱۰ λ
آب مقطر	۱۲ λ

به‌منظور تأیید PCR انجام‌شده، الکتروفورز روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد. شایان ذکر است ازآنجایی‌که پرایمرهای طراحی‌شده جزء پرایمرهای شناخته‌شده 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 DNA Marker 1500 bp استفاده شد. سپس به‌منظور شناسایی و تعیین توالی به آزمایشگاه ژنیران فرستاده شد.

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 (Neighboor_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 حداقل‌کردن 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 براث 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 کشت‌شده به این محیط، انتقال و در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. توانایی رشد باکتری‌های مطالعه‌شده 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 به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد.

doi: 10.22108/bjm.2024.143024.1617

آنتی‌بیوگرام

به‌منظور 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 سواپ استریل از سوسپانسیون تهیه‌شده نمونه برداشته و آب اضافی خارج شد. سوآپ آغشته به باکتری مدنظر روی محیط مولرهینتون آگار استریل در جهات مختلف به‌صورت 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 خط‌کش 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 به‌صورت 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 براث 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 براث حاوی ۰/۳ 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 به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر بررسی شد. سپس ضریب بازدارندگی نمونه‌ها با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد.

$$\text{Cinh}=\sim\frac{(T8-Tcontrol-T8tratment)}{T8-T0control}$$

ضریب بازدارندگی رشد Co-efficient

Cinh: of inhibition

جذب نوری در محیط کشت بدون بایل ،پس از ۸ ساعت گرمخانه گذاری 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 ازنظر تحمل نمک صفرا قابل قبول است.

فعالیت ضدمیکروبی

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

doi: 10.22108/bjm.2024.143024.1617

برداشت و روی محیط مولرهینتون آگار به‌صورت چمنی کشت داده شد. سپس حفره‌ای در مرکز هر پلیت توسط پیپت پاستور استریل، ایجاد و از سوسپانسیون باکتری مدنظر با سمپلر به میزان ۱۰ میکرولیتر درون حفرات ایجادشده اضافه شد.

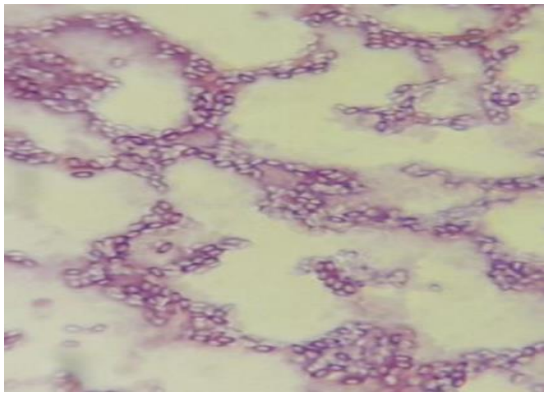
نتایج

رنگ‌آمیزی گرم و تست کاتالاز

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

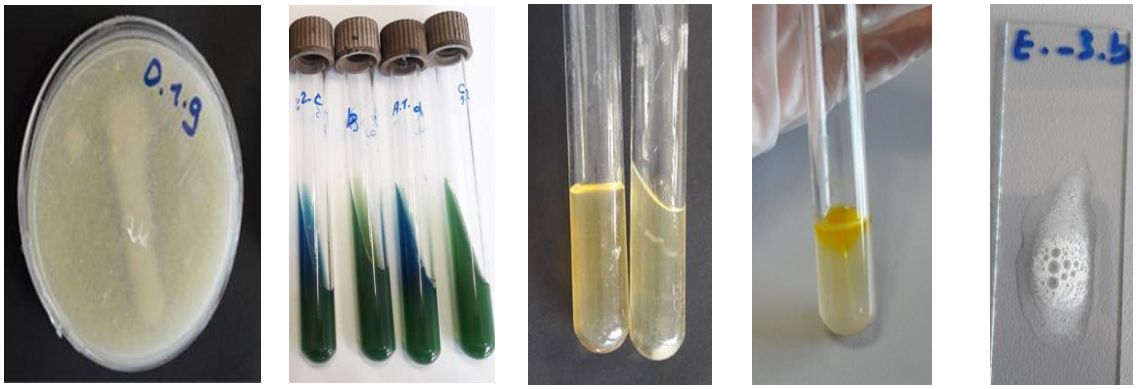
نتایج تست تخمیر قند

به‌منظور 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 نشان‌دهندهٔ توانایی تخمیر قند مدنظر توسط باکتری است. در این آزمایش رنگ قرمز منفی و رنگ زرد و نارنجی پررنگ به‌صورت مثبت گزارش شده‌اند. با توجه به شکل ۲، از بین ۱۵ سویه جداشده، همه سویه‌ها توانایی تخمیر گلوکز را داشتند و ۸۰ درصد سویه‌ها توانایی تخمیر مانیتول و آرابینوز و ۴ سویه توانایی تخمیر قند گزایلوز 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



شکل ۲: نتایج تست هیدرولیز قندها از چپ به راست گلوکز، مانیتول، آرابینوز، گزایلوز (تغییر رنگ لوله از رنگ قرمز نشان‌دهندهٔ مثبت‌بودن 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 تولید اندول و حرکت

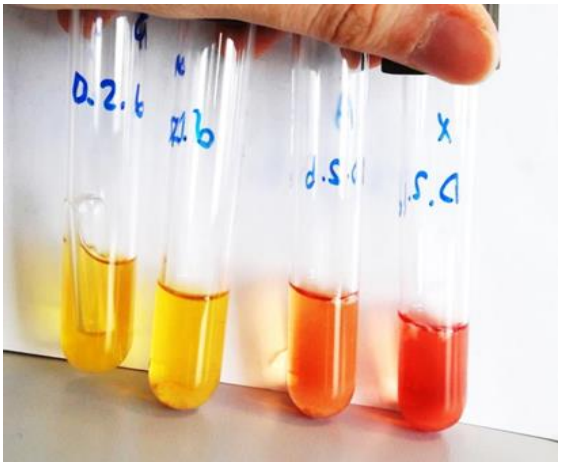
در محیط SIM سویه‌ها ازنظر ایجاد اندول و حرکت بررسی شدند (شکل ۳). سویه‌های پروبیوتیکی بهتر است اندول مثبت باشند. کدورت در مسیر آنس در محیط کشت نشان‌دهندهٔ حرکت مثبت باکتری است.

نتایج آزمون هیدرولیز ژلاتین

توانایی تولید آنزیم ژلاتیناز نیز در سویه‌های باکتریایی به‌عنوان 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

doi: 10.22108/bjm.2024.143024.1617

بررسی‌شده 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، سیترات، ژلاتیناز، حرکت، کاتالاز

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

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 زردهٔ تخم‌مرغ، پس از شکسته‌شدن لیستین (لیستین در امولوسیون زردهٔ تخم‌مرغ نقش پایدارکننده را به عهده دارد) و پروتئین‌های نامحلول زردهٔ تخم‌مرغ است که بر اثر آزادشدن چربی‌ها رسوب می‌کند. تمامی سویه‌ها لیستیناز مثبت گزارش شدند که در شکل ۳ آمده‌اند.

نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی و تست‌های تأییدی

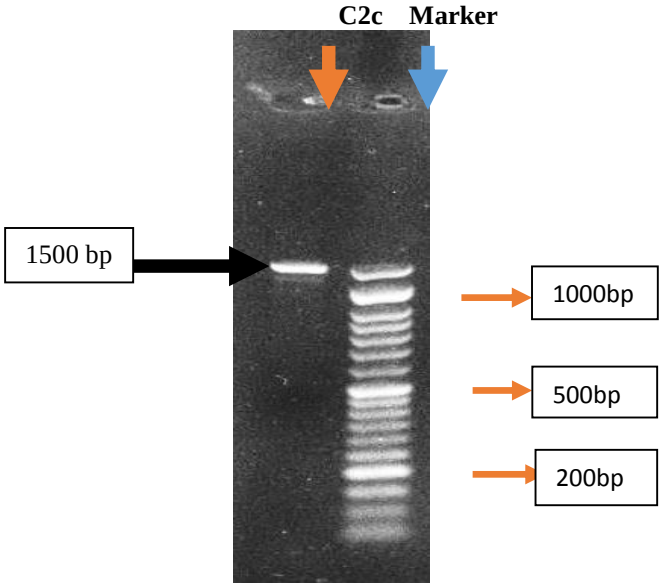
با توجه به نتایج حاصل از آزمون‌های تست کاتالاز و سایر تست‌های تأییدی شامل تست سیترات، تست حرکت، تست تخمیر قندها، آزمون‌های هیدرولیز ژلاتین و لیستیناز، سویه مدنظر به‌صورت تخمینی به‌عنوان جنس باسیلوس مشخص شد. نتایج تست‌های بیوشیمیایی ۱۵ سویه جداشده از خاک در جدول ۴ آمده‌اند.

جدول ۴: نتایج تست‌های بیوشیمیایی

Table 4: Results of Biochemical Tests

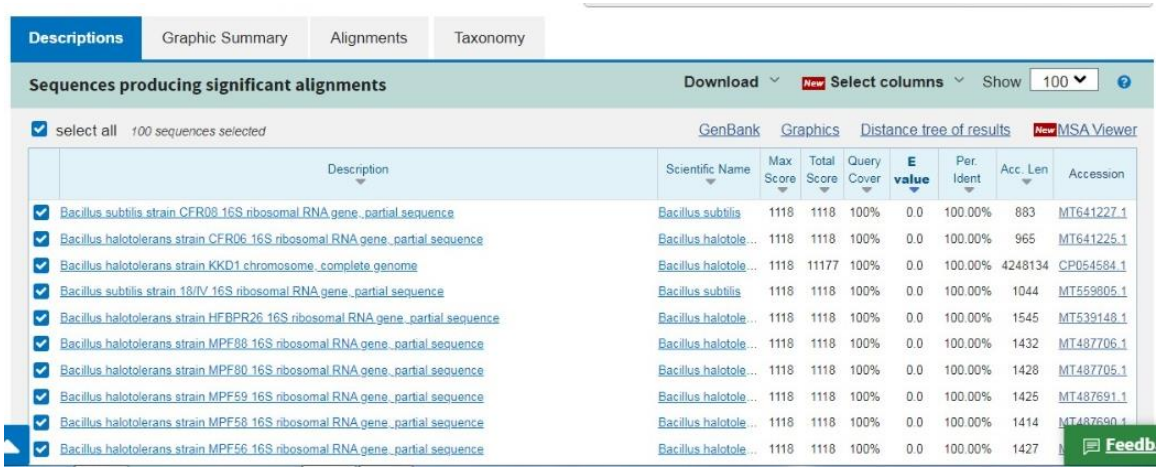
سویه	کاتالاز	سیترات	ژلاتین	SIM حرکت	گلوکز	آرابینوز	مانیتول	گزایلوز	لیستیناز	بلادآگار
E3b	+	+	-	+	+	+	+	+	+	A
C2e	+	-	+	-	+	–	–	+	+	**
F4b	+	-	+	-	+	–	+	–	+	B
D1g	+	-	-	-	+	–	–	–	+	**
D2b	+	+	+	+	+	+	+	–	+	γ
C2b	+	-	+	-	+	–	–	–	+	**
D3b	+	+	+	-	+	+	+	–	+	B
D2a	+	+	+	-	+	–	+	+	+	γ
B1c	+	-	-	+	+	+	+	+	+	**
E4a	+	+	+	-	+	+	+	–	+	B
A1d	+	+	+	-	+	+	+	–	+	A
C2c	+	+	+	+	+	+	+	–	+	γ
C2a	+	-	+	+	+	–	+	–	+	A
F2e	+	-	+	-	+	+	+	–	+	γ
A1c	+	+	+	-	+	+	+	–	+	B

doi: 10.22108/bjm.2024.143024.1617



شکل ۴: الکتروفورز نمونه‌های PCR

Figure 4: Electrophoresis of PCR Samples



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

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 جداشده با استفاده از کیت خریداری‌شده از شرکت سیناکلون Catalog Number: EX6071 انجام شد. از آنجایی که در این پژوهش کیفیت و خلوص DNA برای ما بسیار اهمیت داشت، از کیت تجاری به‌جای روش جوشاندن استفاده شد (12).

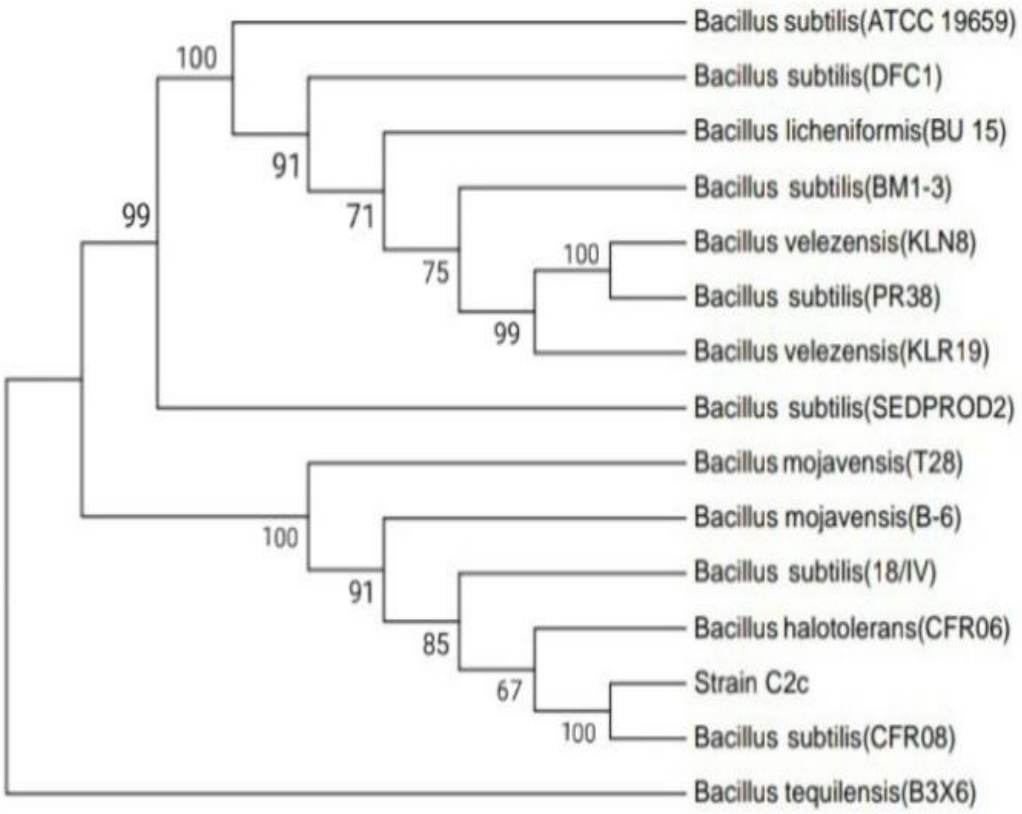
۲. تکثیر ژن *16S rRNA*: با استفاده از پرایمرهای 27F(5'-AGAGTTTGGATCMTGGCTCAG-3') و 1429R(5'-CGGTTACCTTGTTACGACTT-3')، ژن *16S rRNA* تکثیر شد. نتایج حاصل از نواربندی تکثیریافته در شکل ۴ آورده شده‌اند.

doi: 10.22108/bjm.2024.143024.1617

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

رسم درخت فیلوژنتیکی

تجزیه و تحلیل توالی *16S rRNA* سویه C2c به‌منظور 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.



شکل ۶: تجزیه و تحلیل توالی *16S rRNA* جدایه C2c به‌منظور تعیین موقعیت فیلوژنی این باکتری در میان سایرباکتری‌ها 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

نتایج آزمون‌های پروبیوتیک

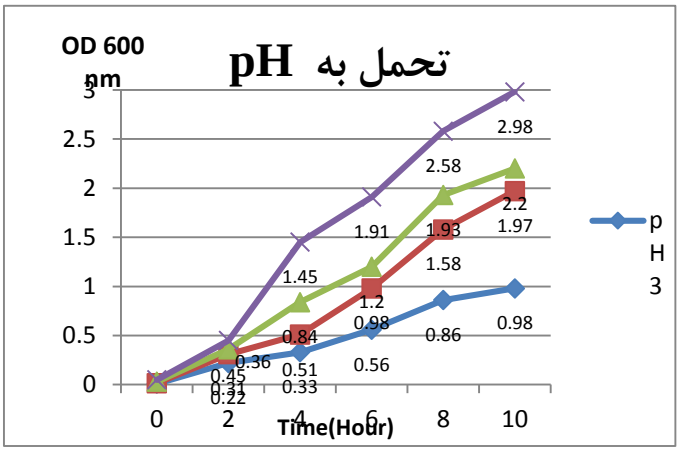
ارزیابی بقای سویه‌ها در محیط اسیدی و قلیایی

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 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 به‌دلیل

doi: 10.22108/bjm.2024.143024.1617

نداشتن توانایی رشد در شرایط اسیدی حذف شدند. منحنی رشد سویه برتر در زمان‌های مختلف توسط دستگاه اسپکتروفتومتر ترسیم شد. طبق نتایج به‌دست‌آمده، سویه C2c بهترین رشد را در pH ۴ در زمان‌های مختلف نشان داد و در pH ۳ رشد باکتری به‌کندی صورت گرفت. طبق نتایج حاصل از نمودار ۳-۱ به نظر می‌رسد سویه مدنظر توانایی رشد در شرایط اسیدی را در زمان‌های مختلف دارد (جدول ۶ و نمودار ۱).



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	-	-	-	+	+	+	+	+

doi: 10.22108/bjm.2024.143024.1617

جدول ۶: نتایج اسپکتروفتومتری 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

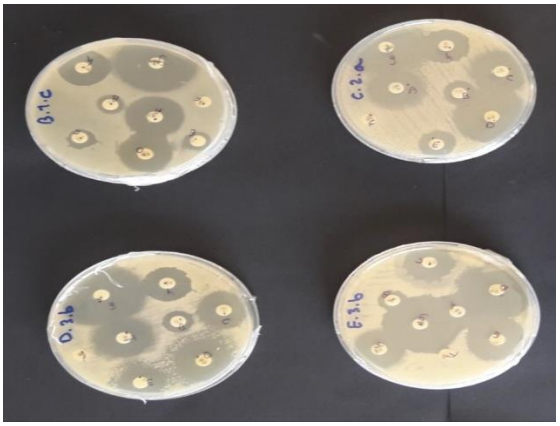
Table 7: Results of Antibiogram

V			LEV			CAZ			CH			TE			C			S			GM			آنتی بیوتیک	
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≤	15-20	≤14	20≤	15-20	≤14	20≤	15-20	≤14	20≤	15-20	≤14	20≤	15-20	≤14	20≤	15-20	≤14	20≤	15-20	≤14	20≤	15-20	≤14	سویه	ردیف
23			36			-			29			35			25			13			26			E3b	-1
21			27			-			20			20			20			15			22			C2e	-2
22			35			-			27			30			23			13			25			F4b	-3
20			26			-			19			21			20			15			22			D1g	-4
22			34			-			25			27			25			13			23			D2b	-5
20			25			-			20			20			17			11			22			C2b	-6
22			34			-			25			30			22			14			27			D3b	-7
35			30			-			27			35			25			15			27			D2a	-8
24			37			-			13			26			12			14			26			B1c	-9
22			28			15			27			35			23			14			30			E4a	-10
23			36			-			25			32			23			15			26			A1d	-11
25			30			17			27			37			27			15			25			C2c	-12
22			37			-			17			35			27			15			26			C2a	-13
20			38			-			25			35			28			14			28			F2e	-14
20			28			15			25			35			20			15			20			A1c	-15

نتایج آنتی‌بیوگرام

تمام ۱۱ سویه حساسیت خود را به آنتی‌بیوتیک‌های ذکرشده به‌صورت هاله‌ای اطراف دیسک به نمایش گذاشتند (شکل ۷). شایان ذکر است تمام باکتری‌ها به‌جز سویه C2c در برابر آنتی‌بیوتیک سفتازیدیم مقاوم بودند؛ به‌طوری‌که هاله‌ای در اطراف دیسک آنتی‌بیوتیکی مشاهده نشد. نتایج حاصل از آنتی‌بیوگرام در جدول ۷ آمده‌اند.

doi: 10.22108/bjm.2024.143024.1617



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

توانایی رشد باسیلوس‌ها در دما و غلظت‌های مختلف نمک سدیم کلراید

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.

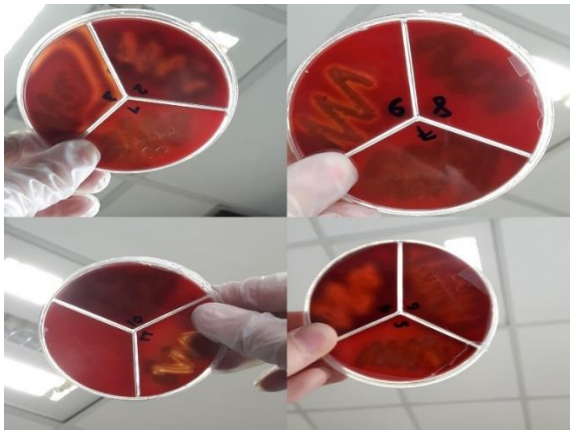
در ادامه رشد ۱۱ سویه منتخبی که مقاومت و بقای قابل قبولی در شرایط اسیدی داشتند، در غلظت‌های نمک سدیم کلرید ارزیابی شدند. در بین ۱۱ سویه رشد قابل قبولی در غلظت‌های ذکرشده از نمک سدیم کلرید مشاهده شد؛ به‌طوری‌که در غلظت ۲ درصد، کدورت حاصل از رشد بسیار زیاد بود. رشد تعدادی از باکتری‌ها در غلظت ۸ درصد کاهش 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 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

doi: 10.22108/bjm.2024.143024.1617

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).

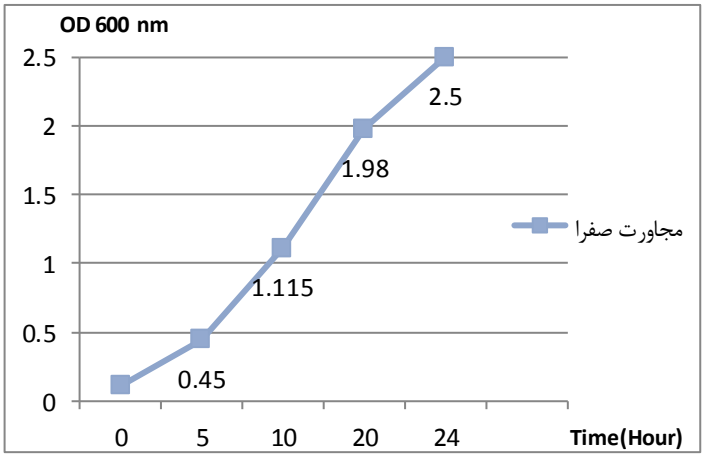
نتایج فعالیت ضدمیکروبی

در بررسی فعالیت ضدمیکروبی مشخص شد سویه C2c علیه پاتوژن‌های سالمونلا و اشرشیا کلی و استاف اورئوس، اثر ضدمیکروبی بهتری از خود نشان داده و هاله‌های شفافی در اطراف چاهک‌ها ایجاد کرده است.

جدول ۹: نتایج اسپکتروفتومتری 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 ۳٪
0	0/11
5	0/45
10	1/115
20	1/98
24	2/5



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.

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) ارگانیسم 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 مقاوم هستند. همچنین، احتمال بیشتری برای زنده ماندن در دستگاه گوارش فوقانی و رسیدن به روده بزرگ دارند. به باکتری‌های پروبیوتیک تشکیل‌دهندهٔ اسپور ازلحاظ 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 باارزش با توانایی درمانی زیستی و تحریک ایمنی همراه است. در این پژوهش علاوه بر آزمایش‌های مورفولوژی و بیوشیمیایی برای

doi: 10.22108/bjm.2024.143024.1617

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 جداسازی‌شده 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 ازنظر فاکتورهای پاتوژنی مانند تولید توکسین و سایر فاکتورهای ویرولانس، برای ارائه ارزیابی دقیق‌تر ضروری است.

میکروارگانیسم‌های 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 ازنظر 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 ضدمیکروبی 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 ضدمیکروبی 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 pH ۲–pH ۳ 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 pH ۲ و نمک‌های صفراوی با غلظت ۰/۳ درصد را داشته است. همچنین، بالاترین فعالیت ضدمیکروبی 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 جداسازی‌شده می‌تواند به‌عنوان پروبیوتیک استفاده شود. با این تفاوت که باسیلوس سوبتیلیس جداشده در این پژوهش قابلیت زنده‌ماندن در pH ۲ را نداشت. در مطالعه دیگری که Kristoffersen و همکارانش انجام دادند، میزان رشد ۴۰ سویه باسیلوس در برابر غلظت‌های ۰/۰۰۵ تا ۰/۲ نمک صفرا آزمایش شد. نتایج نشان می‌دهند سویه‌های باسیلوس سرئوس و باسیلوس مگاتریوم، فقط قادر به تحمل میزان ۰/۰۰۵ نمک صفرا بوده‌اند؛ درحالی‌که در این

doi: 10.22108/bjm.2024.143024.1617

مطالعه سویه باسیلوس سوبتیلیس قادر به تحمل میزان ۰/۳ درصد نمک صفرا است (19). در مطالعه Aslim و همکارانش در سال ۲۰۰۲، گزارش شد سویه‌های باسیلوس سوبتیلیس، باسیلوس مگاتریوم و باسیلوس تورنجنسیس در برابر پاتوژن‌های اشرشیا کلی و یرسینیا انتروکولیتیکا اثر ضدمیکروبی 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 نووبیوسین، سفتیوفور، کلیندامایسین، اریترومایسین و باسیتراسین، مقاوم و نسبت به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها (اسپتینومایسین، تریپل سولفاتت، تتراسایکلین، ارمتوپریم، 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 همولتیک 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 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 rpoBو recA 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 صفراوی، به‌عنوان مهم‌ترین ویژگی باکتری‌های پروبیوتیک داشت و همچنین مقاومت به برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها و فعالیت ضدباکتریایی آن علیه پاتوژن‌های *Escherichia coli*، *Salmonella* و *Staphylococcus aureus* با نام *Bacillus subtilis CFR08* به‌عنوان یک پروبیوتیک بالقوه شناسایی شد؛ اما درنهایت 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 ازلحاظ 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://ncmbjpiau.ir/article-1-1140-fa.html [In Persian].

(2) Elshaghabee 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-Frąckowiak J, Seroczyńska K, Bieganowski 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

(9) Kyriakis SC, Tsiloyiannis 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) AlGburi 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