نشریه علوم دامی
(پژوهش و سازندگی)

شماره ۱۲۵، زمستان ۱۳۹۸
ص‌ص: ۱۶۷~۱۸۴

بررسی ایمنی زیستی باکتری‌های جنس باسیلوس جداشده ازروده مرغ گوشتی و زنبور عسل به عنوان پروبیوتیک به کمک شناسایی ژن‌های تهدیدگر و آزمون‌های بیوشیمیایی

- **نازنین رضوانیان**
دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج
- **ناهید مژگانی** (نویسنده مسئول)
دانشیار موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی- سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج-ایران.
- **نرگس واسجی**
عضو هیئت علمی موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج-ایران

تاریخ دریافت : خرداد ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش : بهمن ۱۳۹۷

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۲۳۶۳۹۸۲۴
Email: dnmoj@yahoo.com

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/asj.2019.122323.1724

چکیده

تعدادی از گونه های باسیلوس به عنوان پروبیوتیک موثر و مفید شناخته شده اند. ولیکن بعضی از گونه‌های باسیلوس دارای ژن-های ویرولانسی می‌باشند که عامل اصلی بیماری بوده پس باید قبل از استفاده بعنوان پروبیوتیک از نظر ایمنی بررسی شوند. تاکنون هیچ مطالعه‌ای بر روی ژن‌های ویرولانس باسیلوس‌های که بعنوان پروبیوتیک شناسایی شده اند در ایران صورت نگرفته است. اهداف این تحقیق ارزیابی ایمنی زیستی سویه‌های باسیلوس حاصل از نمونه های مرغ گوشتی (باسیلوس سوبتیلیس و باسیلوس لشنی فورمیس) و زنبور عسل (باسیلوس سوبتیلیس و باسیلوس مگاتریوم) می‌باشد. در ابتدا جدایه‌های با استفاده از روش های بیوشیمیایی و مولکولی شناسایی شدند. تمامی جدایه ها از نظر خواص پروبیوتیکی از جمله مقاومت در برابر اسید و صفرا، فعالیت ضد میکروبی در برابر استرپتوکوکوس آگالاکتیه، انترکوکوس فکالیس، استافیلوکوکوس اورئوس، سودوموناس اریژنوسه، سالمونلا تیفی موریوم، لیستریا مونوسیتوژنز و اشریشیا کولای و الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی، مورد ارزیابی قرارگرفتند .فعالیت همولیتیک، DNase ، لسیتیناز، لیپاز، ژلاتیناز و کوآگولاز نیز مطالعه شدند. در نهایت حضور یا عدم حضور ژن‌های ویرولانسی به روش مولکولی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. تمامی گونه های باسیلوس مورد مطالعه تحمل قابل توجهی را نسبت به اسید و نمک صفرا نشان دادند و به آنتی بیوتیک‌های ذکر شده حساس بودند. ۷ سویه بتاهمولیتیک و لسیتیناز مثبت و یکی از سویه-هاDNase مثبت بود. ژن ویرولانسی cytK در چهار و LipA در دو جدایه مشاهده شد. در میان ۱۱ جدایه ها ، تنها دو نمونه جدا شده از دستگاه گوارش مرغ گوشتی فاقد ژن‌های ویرولانس بوده و بعنوان پروبیوتیک ایمن دسته بندی گردیدند.

واژه‌های کلیدی: پروبیوتیک، *باسیلوس*، ژن‌های ویرولانس، PCR، 16S rRNA

Animal Science Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 125 pp: 167-184

Evaluating the Safety of Bacillus Species Isolated from Broiler Chickens and Honey bee as a Probiotic by Detecting Virulence genes via Biochemical and Molecular Methods

By: Nazanin Rezvaniyan[1], Naheed Mojgani*[2], Narges Vaseji[3]
1-MSc student Microbiology Department, Islamic Azad University, Karaj Branch-Iran.
2-Associate professor, Biotechnology Dept, Razi Vaccine and Serum Research Institute- Agriculture Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran.
3-Member of scientific board, Dept. of Biotechnology, Animal Science Research Institute of Iran (ASRI), Agriculture Research, Education and Extension Organization,Karaj, Iran.

Received: June 2018 **Accepted: February 2019**

A number of bacillus species have been recognized as effective and beneficial probiotics. However, some of the bacillus species are known to carry virulence genes which are the main cause of disease, hence, it is essential to evaluate their safety before considering them as probiotic. To date, in our country no studies have been performed on the genotypic virulence determinants of Bacillus species recognized as probiotics. In this study we aimed to assess the safety of indigenous bacillus species isolated from broiler chicken (*Bacillus subtilis* and *B.leichniformis*) and honey bee (*B.subtilis* and *B.megaterium*) samples. The selected bacillus species were identified based on biochemical and molecular, and evaluated for their probiotic properties such as acid and bile resistance, antimicrobial activity against *Streptococcus agalactiae, Enterococcus faecalis, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella typhimurium, Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*, and antibiotic susceptibility pattern. The hemolytic activity, DNase, lecithinase, lipase, gelatinase, and coagulase activity were also studied. The presence of virulence genes, including hbl, Nhe, cytK, bceT, lipA, ces, was analyzed by molecular methods in a PCR reaction. According to results, all 11 Bacillus species showed considerable resistance to acid and bile, and appeared sensitive to all tested antibiotics. Seven isolates (TA009, TA0045, TA0046, TA0056, TA0073, TA0074 and TA00168) were beta hemolytic and lecitinase positive, one isolate (TA0049) was DNase positive, four isolates (TA0049, TA0056, TA0073, and TA00168) were cytK positive, while TA0044 and TA0046 were LipA positive. Only two isolates (TA00170 and TA00171) of poultry origin lacked all tested virulence genes and were classified as safe probiotic.

Key words: Probiotic, Bacillus, Virulence factors, PCR, 16S rRNA.

مقدمه

باکتری‌های مفید به دلیل نقش ارزنده‌ای که در اصلاح شرایط میکروبیولوژیک روده دارند، می‌توانند نقش مهمی در سلامت دستگاه گوارش انسان، دام و طیور داشته باشند. این باکتری های مفید که پروبیوتیک نامیده می شوند به طور گسترده سراسر جهان جهت سلامت مصرف کنندگان مورد استفاده قرار می‌گیرند. گونه‌ها و سویه‌های خاص باکتریایی با خواص پروبیوتیکی می-توانند بر مقاومت به باکتری‌های بیماری زا، کمک به هضم لاکتوز ، تعدیل سیستم ایمنی بدن، جلوگیری از رشد بیش از حد باکتری ها در روده کوچک، کاهش چربی خون ، کاهش فشار خون و کمک به کاهش آلرژی ها، عفونت ادراری، عفونت هلیکوباکتر پیلوری، و آنسفالوپاتی کبدی تاثیر داشته باشند این واقعیت که هر فرد حامل حدود سه تا چهار و نیم پوند باکتری فعال در روده می باشد، به اثبات رسیده است همچنین مشخص شده است که این باکتری ها و متابولیت های آن ها می توانند اثرات عمیقی بر سلامتی بدن و سوخت و ساز بدن داشته باشند. برخی از باکتری-های مهمی که به عنوان باکتری های مفید و پروبیوتیک استفاده می‌شوند شامل باکتری‌های اسیدلاکتیک گونه های لاکتوباسیلوس، لاکتوکوکوس، انتروکوکوس و بیفیدوباکتریوم

می باشند. در چند سال اخیر، باکتری های غیر از خانواده باکتری اسید لاکتیک مانند باسیلوس ها بعنوان پروبیوتیک شناخته شده اند (Osipova ;Sanders, 1999 و همکاران،۱۹۹۷).

در رو دهه اخیر در اروپا و آسیای جنوب شرقی از چندین گونه باسیلوس به عنوان پروبیوتیک استفاده شده است (Hosoi و همکاران،۱۹۹۹ ; Hoa و همکاران، ۲۰۰۰).با وجود این‌که *باسیلوس سوبتیلیس* و *باسیلوس لشنی فرمیس* باکتری‌های تشکیل دهنده اسپور موجود در خاک می‌باشند، ممکن است *باسیلوس سوبتیلیس* به طور دائم در پوست انسان نیز وجود داشته باشد(Hosoiوهمکاران،۱۹۹۹ ; Braide و همکاران،۲۰۱۱ Gerald ; و همکاران، ۲۰۰۳). از بین باکتری‌های پروبیوتیک، باکتری‌های *اسید لاکتیک* و *باسیلوس‌ها*، بیش از همه مورد مطالعه قرار گرفته اند و تحقیقات متعددی، اثرات سودمند این گروه از باکتری‌ها را در سلامتی انسان نشان داده اند که از جمله این اثرات می‌توان به افزایش ایمنی بدن و اثرات ضد باکتریایی اشاره نمود. باکتری-های *باسیلوس*، به دلیل فعالیت‌های متابولیکی بالا، نقش مهمی را در روده ایفا می‌کنند. فعالیت باسیلوس‌ها تا حد زیادی به توانایی آن‌ها در تولید آنتی بیوتیک‌ها بستگی دارد. مشخص شده که ۷۹۵ آنتی بیوتیک مختلف توسط باکتری‌های *باسیلوس* تولید می‌گردد. به عنوان مثال، گونه‌های *باسیلوس سوبتیلیس*، ۶۶ نوع آنتی بیوتیک تولید می‌کنند و ۵-۴٪ از ژنوم آن‌ها به سنتز آنتی بیوتیک‌ها اختصاص یافته است. آنتی بیوتیک‌های *باسیلوسی* از نظر ساختار و طیف فعالیت متفاوت هستند. برای مثال، آمینو گلیکوزید بوتیروسین از *باسیلوس سیرکولانس*[1]، پروتیسین حاوی فسفر از *باسیلوس لشنی فورمیس*[2]، ایزوکومارین از مشتقات باسیفلاسین از *باسیلوس تیامینولیتیکوس*[3] و آمیکومایسین از *باسیلوس سوبتیلیس*[4]تولید می شوند.. برخی از سویه‌های *باسیلوس*، باکتریوسین‌ها را سنتز می‌کنند که تنها در برابر باکتری‌های گونه باسیلوس موثر هستند، مابقی آنتی بیوتیک‌ها در برابرسایر باکتری‌های گرم منفی یا گرم مثبت و سایر میکروارگانیسم ها(از جمله قارچ‌ها و تک یاخته‌ها) فعالیت می‌کنند. این آنتی بیوتیک‌ها تحت شرایط هوازی و بی هوازی سنتز می‌شوند. تولید آنزیم های لایتیک نیز می تواند به فعالیت ضد میکروبی باکتری‌های *باسیلوس* کمک کند. انسان به طور مداوم در معرض گونه های باسیلوس موجود در محیط زیست قرار دارد که ممکن است هیچ نشانه‌ای از عفونت (به جز *باسیلوس آنتراسیس* و *باسیلوس سرئوس*) یا اثرات بیماری را ایجاد نکنند. امروزه با توجه به وجود روشهای دقیق و حساس، امکان تشخیص مقادیر بسیار کم توکسین نیز وجود دارد و بنابراین استفاده از سویه های مولد توکسین (حتی به میزان کم) و بیماری‌زا جهت استفاده به عنوان پروبیوتیک ممنوع می باشد.در تحقیقات مختلفی، تولید سموم در بین گونه های *باسیلوس* و استفاده از آنها در مصارف تجاری بررسی شده است. اطلاعات لازم در مورد اساس ژنتیکی-(وجود ژن‌های ویرولانس) و بیوشیمیایی تولید توکسین و روش-های شناسایی توکسین های تولید شده توسط *باسیلوس ها* در این مقالات بررسی و روش‌های مطمئن جهت اثبات وجود توکسین معرفی شده اند (Sorokulova،2014 ; Chesson،2002).

هدف تحقیق حاضر، ارزیابی ایمنی زیستی سویه‌های *باسیلوس* با استفاده از روش‌های مولکولی و بیوشیمیایی می‌باشد.

1- *B. circulans*

2- *B. licheniformis*

3- *B. thiaminolyticus*

4- *B. subtilis*

جدول ۱-ترکیب نوکلئوتیدی پرایمرهای عمومی مورد استفاده جهت شناسایی سویه‌ها

توالی	پرایمرها
GCACAAGCGGTGGAGCATGTGG	EUB-F
GCCCGGGAACGTATTCACCG	EUB-R

محصول PCR بر روی ژل آگارز ۰/۸ درصد الکتروفورز قرار گرفت و باند bp ۴۵۴ متعلق به جنس باسیلوس، با استفاده ازکیت خالص سازی PCR(کیاژن، آلمان)،بدست آمد. باندهای حاصله پس از تخلیص جهت تعیین سکانس به شرکت 1st base مالزی فرستاده شدند. تمامی سکانس‌های به دست آمده در پایگاه اطلاعاتی NCBI در قسمت Blast[۵]در حد گونه شناسایی و ثبت شدند.

بررسی خصوصیات پروبیوتیکی

بررسی مقاومت به اسید

به منظور بررسی مقاومت باکتری‌ها به اسید، از محیط مایع MRSاستریل که به کمک اسیدکلریدریک(HCL) ۱۰نرمال و سود (NaOH) ۱۰ نرمال، pH آن به ترتیب در حد ۶/۵، ۴، ۳، ۲/۵، ۲ تنظیم شدند، استفاده گردید. ۱۰۰ میکرولیتر از باکتری‌های تازه کشت شده به این محیط انتقال و درانکوباتور در دمای ۳۷ درجه سلسیوس نگهداری و رشد باکتری‌ها در زمان‌های ۰، ۱، ۲، ۴،۳ساعت در طول موج ۶۲۰ نانومتر به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر(مدلSmartSpect plus ،شرکت BIORAD آمریکا) اندازه‌گیری شد (Flahaut و همکاران،۱۹۹۶; Buntin و همکاران،۲۰۰۸).

بررسی مقاومت به نمک صفرا

از کشت تازه باکتری‌ها به میزان ۱۰۰ میکرولیتربرداشت شد. این باکتری‌ها در شرایط استریل به محیط‌های MRS مایع حاوی ۰/۳، ۰/۷، ۱ درصد نمک صفرای استریل، اضافه شدند. سپس رشد باکتری‌ها در زمان ۰،۲،۴،۸،۲۴ ساعت به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۲۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت(Cheighو همکاران،۲۰۰۲; Semedo وهمکاران،۲۰۰۳). سپس ضریب بازدارندگی نمونه‌ها با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید(Foulquié Moreno و همکاران،۲۰۰۶).

$$\text{Cinh} = \frac{(\Delta T8-T0\ \text{control}-\Delta T8-T0\ \text{treatment})}{\Delta T8-T0\ \text{control}}$$

Cinh: ضریب بازدارندگی رشد Co-efficient of inhibition

Δ: اختلاف در جذب بین T0 (زمان خواندن در صفر ساعت)و T8 (زمان خواندن بعد از ۸ ساعت)

اگر ضریب بازدارندگی کمتر از ۰/۵ باشد باکتری پروبیوتیک از نظر تحمل نمک صفرا قابل قبول میباشد ((Gopal et al 1996

[۷]- Nucleotide blast: Basic Local alignment search tool

بررسی اثر ضدمیکروبی باسیلوس‌های جدا شده علیه باکتری‌های بیماری‌زا

باکتری‌های پاتوژن مورد بررسی(استرپتوکوکوس آگالاکتیه[6]، انترکوکوس فکالیس[7]، استافیلوکوکوس اورئوس، سودوموناس اریژنوسه[8]، سالمونلا تیفی موریوم[9]، لیستریا مونوسیتوژنز و اشریشیا کولی K99) به میزان ۱۰۰ µl درون محیط MRS آگار۱٪ اضافه شده و پس از ریختن درون پلیت، حفراتی درون آن ایجاد می شود، سپس باکتری باسیلوس جداسازی شده(باسیلوس سوبتیلیس ، باسیلوس لشنی فورمیس و باسیلوس مگاتریوم) به میزان ۱۰µl درون حفرات ایجاد شده اضافه می‌شود (Todorov and Dicks، ۲۰۰۵).

بررسی حساسیت *باسیلوس‌ها* نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها

مقاومت باسیلوس‌ها(باسیلوس سوبتیلیس ، باسیلوس لشنی فورمیس و باسیلوس مگاتریوم)، نسبت به ۱۷ نوع آنتی بیوتیک ، با روش انتشار دیسک (Disk diffusion) بررسی شد. آنتی - بیوتیک‌های انتخابی شامل، سفازولین(µg ۳۰) ، داکسی ساکلین (µg ۳۰)، نالیدیکسیک اسید (µg ۳۰)، انروفلوکساسین(µg ۵)، سفالوتین (µg ۳۰)، ایمی پنم (µg ۱۰)، اگزالین (µg ۱)، آموکسی سیلین(µg ۲۵)، سفالکسین (µg ۳۰)، جنتامایسین (µg ۱۰)، آمپی‌سیلین(µg ۱۰) وانکومایسین (µg ۳۰)، تتراسایکلین (µg ۳۰)، کلرامفنیکل (µg ۳۰)، پنی‌سیلین (µg ۱۰)، کلیندامایسین (µg ۲) و اریترومایسین (µg ۱۵) بودند. قطر هاله عدم رشد با خط کش اندازه گیری شد.

بررسی فنوتیپی ویرولانس در *باسیلوس‌های* منتخب با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی

باکتری‌های باسیلوس مورد مطالعه(باسیلوس سوبتیلیس ، باسیلوس لشنی فورمیس و باسیلوس مگاتریوم)، از نظر فنوتیپی جهت بررسی وجود یا عدم وجود فاکتورهای ویرولانسی با استفاده تست کواگولاز، هیدرولیز ژلاتیناز، لسیتیناز،هیدرولیزDNA و تولید لیپازمورد ارزیابی قرار گرفتند(Anderson and Gilliland، Rabbani;۱۹۹۹ ، ۲۰۱۵).

بررسی ژن‌های ویرولانس در *باسیلوس‌های* جدا شده

پس از بررسی فنوتیپی، ژنهای ویرولانسی با استفاده از روش‌های مولکولی و انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز(PCR) ، مورد بررسی قرار گرفتند. پرایمرهای اختصاصی مورد استفاده جهت شناسایی ژن‌های ویرولانس *باسیلوس* در جدول ۲ آورده شده‌اند.

[6] *Streptococcus agalactie*
[7] *Enterococcus faecalis*
[8] *Pseudomonas aeruginosa*
[9] *Salmonella typhimurium*

جدول ۲- لیست پرایمرهای اختصاصی مورد استفاده جهت شناسایی ژن‌های ویرولانس *باسیلوس*

ژن	نام پرایمر	توالی پرایمر	اندازه قطعه (bp)
hblA	HBLA-N HBLA-C	GCT AAT GTA GTT TCA CCT AGC AAC AAT CAT GCC ACT GCG TGG ACA TAT AA	873
hblC	HBLC-N HBLC-C	AAT AGG TAC AGA TGG AAC AGG GGC TTT CAT CAG GTC ATA CTC	399
hblD	HBLD-N HBLD-C	AAT CAA GAG CTG TCA CGA AT CAC CAA TTG ACC ATG CTA AT	430
hbl	HD2F HA4R	GTA AAT TAT GAT GAT CAA TTT C AGA ATA GGC ATT CAT AGA TT	1091
bceT	BCET-N BCET-C	TTA CAT TAC CAG GAC GTG CTT TGT TTG TGA TTG TAA TTC AGG	428
Nhe	NA2F NB1R	AAG CTG CTC TTC GTA TTC TTT GTT GAA ATA AGC TGT	766
cytK	CKF2 CKR5	ACA GAT ATC GGT CAA AAT GC CAA GTT ACT TGA CCT GTT GC	421
ces	CesF1 CesR2	GGT GAC ACA TTA TCA TAT AAG GTG GTA AGC GAA CCT GTC TGT AAC AAC A	665
lipA	LipA (F) LipA (R)	ATG GTT CAC GGT ATT GGA GG CTG CTG TAA ATG GAT GTG TA	371

نتایج

خصوصیات مورفولوژیک جدایه‌های حاصل از دستگاه گوارش مرغ گوشتی و زنبور عسل در جدول شماره ۳ مشاهده می شود.تمامی جدایه‌ها باسیل گرم مثبت و کاتالاز مثبت بودند.

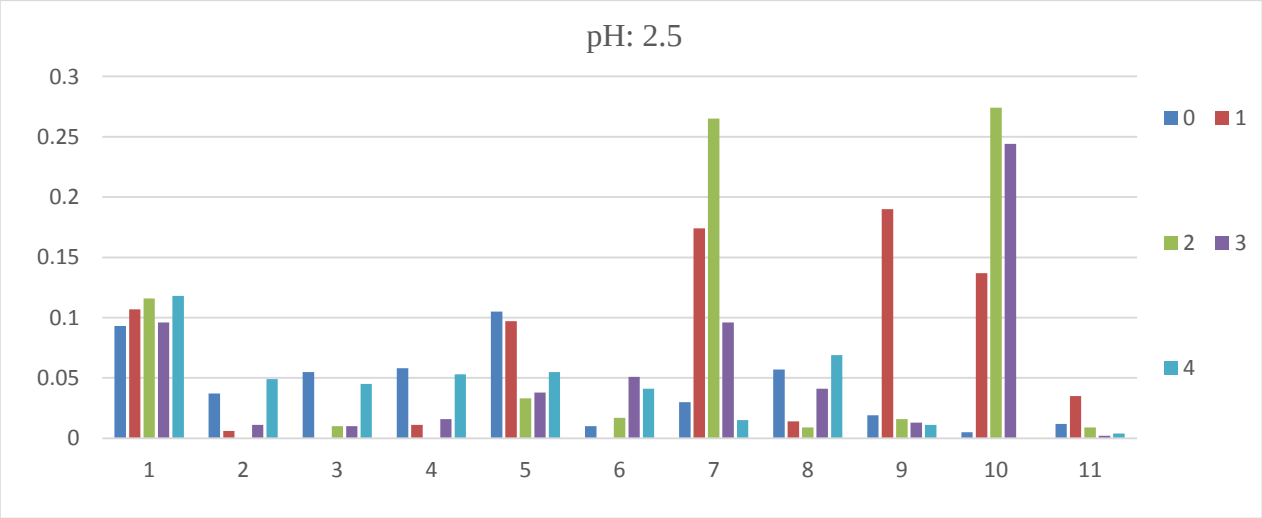
همچنین، بر اساس آزمون‌های بیوشیمیایی انجام شده، سویه‌ها به عنوان باسیلوس سوبتیلیس، مگاتریوم و لشنی فورمیس شناسایی شدند.

جدول ۳- خصوصیات مورفولوژیک باسیلوس‌ها

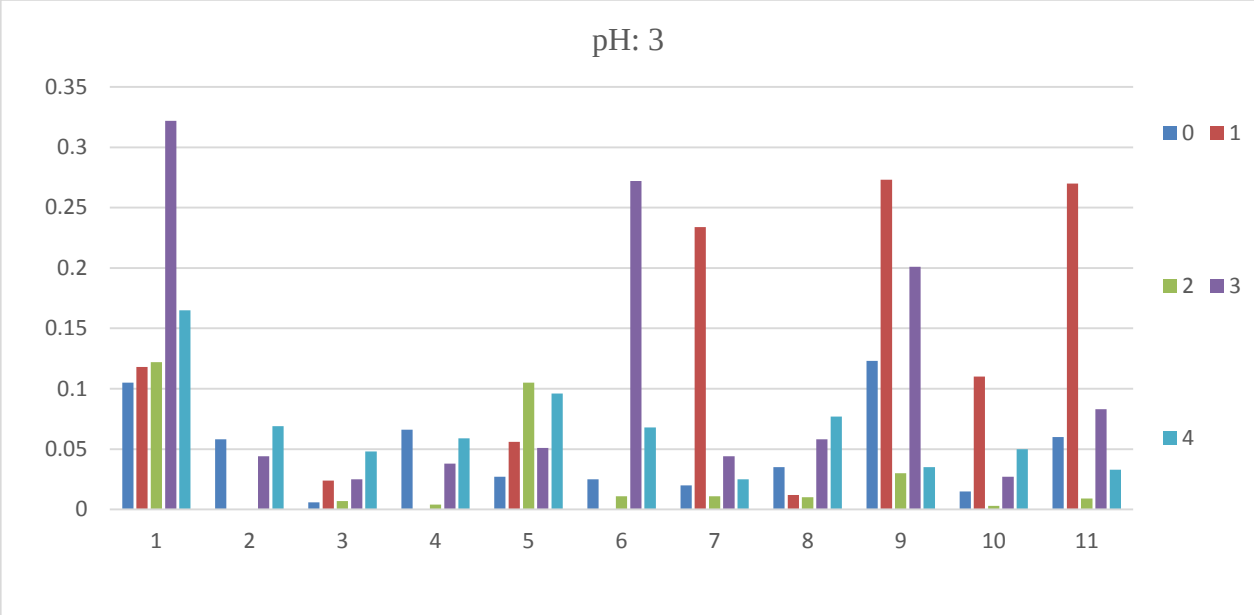
شماره نمونه	برچسب نمونه	منابع جداسازی	آرایش باسیل‌های گرم مثبت	باکتری‌های شناسایی شده
۱	TA009	زنبور عسل	تک و گاها زنجیره ای	باسیلوس مگاتریوم
۲	TA0044	زنبور عسل	زنجیره ای	باسیلوس سوبتیلیس
۳	TA0045	زنبور عسل	تک و گاها زنجیره ای	باسیلوس سوبتیلیس
۴	TA0046	زنبور عسل	دوتایی	باسیلوس سوبتیلیس
۵	TA0049	زنبور عسل	زنجیره ای	باسیلوس سوبتیلیس
۶	TA0056	مرغ گوشتی	دوتایی	باسیلوس سوبتیلیس
۷	TA0073	مرغ گوشتی	تک	باسیلوس سوبتیلیس
۸	TA0074	مرغ گوشتی	دوتایی	باسیلوس لشنی فورمیس
۹	TA00168	مرغ گوشتی	دوتایی	باسیلوس سوبتیلیس
۱۰	TA00170	مرغ گوشتی	زنجیره ای	باسیلوس لشنی فورمیس
۱۱	TA00171	مرغ گوشتی	زنجیره ای	باسیلوس سوبتیلیس

پس از جداسازی و شناسایی اولیه، جدایه ها در حد جنس با استفاده از روش 16SrRNA و پرایمرهای عمومی (Universal) شناسایی شدند .همانطور که در جدول ۳ مشاهده می شود، از ۱۱ نمونه ۸ جدایه باسیلوس سوبتلیس و ۲ نمونه باسیلوس لیشنیفورمیس و یک جدایه متعلق به باسیلوس مگاتریوم بود .

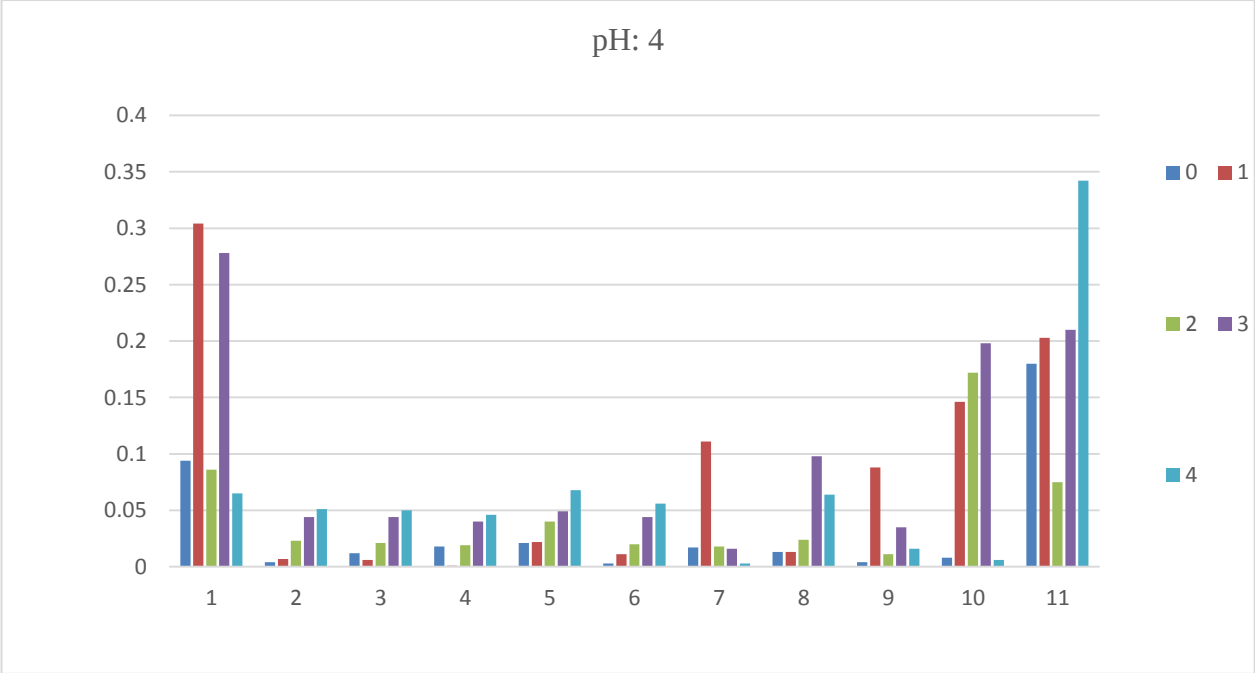
سویه‌های شناسائی شده از نظر خصوصیات پروبیوتیکی ارزیابی شدند. طبق نتایج به دست آمده، همه سویه‌ها در pH های ۲/۵ در زمان‌های مختلف، توانائی رشد را نشان دادند. به جز سویه TA00171که فقط در زمان یک ساعت رشد را نشان داد(نمودار۱). سویه TA00170، بیشترین میزان رشد را در pH ۲/۵ و سویه TA009، بیشترین میزان رشد را در pH ۳ و pH ۴ داشته است(نمودار۲ و ۳).



نمودار ۱ : تحمل به اسید (pH : ۲/۵) در باکتری های *باسیلوس* در زمان ۰،۱،۲،۳،۴ ساعت



نمودار ۲ : تحمل به اسید (pH : ۳) در باکتری های *باسیلوس* در زمان ۰،۱،۲،۳،۴ ساعت



نمودار ۳: تحمل به اسید (pH : ٤) در باکتری های *باسیلوس* در زمان ٤،۳،۲،۱،۰ ساعت

طبق پروتکل استاندارد ملی ایران،شماره ۱۹۴۵۹، جهت تعیین میزان مقاومت به صفرا در باکتری‌ها، معمولا از غلظت‌های نزدیک به شرایط بدن انسان (یا دام) استفاده می‌شود. بنابراین، غلظت-های۰/۳، ۰/۷ و ۱ انتخاب شدند(جدول ۴). تمامی جدایه ها قادر به رشد در ۰/۳ و ۰/۷ درصد نمک صفرا درطی زمان‌های (۲۴، ۶، ۴، ۲، ۰) ساعت بودند. پس از گذشت ۶ ساعت، به جز جدایه‌های TA0044،TA0073 و TA00170، تمامی جدایه‌ها بیشترین میزان رشد را در هر سه غلظت نمک صفرا از خود نشان دادند(در مقایسه با نمونه شاهد که تنها حاوی باکتری‌های مورد نظر و فاقد نمک‌های صفراوی بود) در میان آن‌ها باکتری TA0056در هر سه غلظت نمک صفرا، باکتری TA0045، در غلظت‌های ۰/۳ و ۰/۷ درصد نمک صفرا و باکتری TA0046، فقط در ۰/۷ درصد نمک صفرا بیشترین میزان رشد را داشته-اند(نسبت به تیمار شاهد). بر اساس محاسبه ضریب بازدارندگی (Cinh)، نمونه ها به ۲ دسته تقسیم می شوند: دسته اول شامل نمونه‌هایی می شود که کاملاً به نمک صفرا مقاوم هستند، که تقریباً اثر بازدارندگی رشد آنان صفر است ($Cinh \approx 0$) و رشدی بین ($0.2<Cinh< 0.4$) رادارند، در حالی که دسته دوم تحمل و مقاومت ضعیفی دارند که اثر بازدارندگی آنان ($Cinh > 0.4$)است. بنابراین، سویه‌هایی که اثر بازدارندگی آن-ها بین $0.2< Cinh <0.4$ یا $Cinh\sim0$ باشد دارای مقاومت خوبی نسبت به نمک صفرا هستند. پس از انجام محاسبات مشخص شد که تمامی سویه‌های مورد مطالعه دارای ضریب بازدارندگی کمتر از ۰/۲ و تقریباً بیشتر آن‌ها دارای ضریب بازدارندگی نزدیک به صفر هستند. بنابراین تمام سویه‌ها دارای مقاومت نسبتاً بالایی در غلظت‌های ۰/۳، ۰/۷ و ۱ درصد نمک صفرا هستند.

جدول٤- نتایج بررسی اثر بازدارندگی رشد (Cinh) در باکتری های باسیلوس منتخب

کد نمونه ها	$Cinh = \frac{(\Delta T8-T0\ control-\Delta T8-T0\ treatment)}{\Delta T8-T0\ control}$		
	۰/۳ درصد نمک صفرا	۰/۷ درصد نمک صفرا	۱ درصد نمک صفرا
TA009	0.97	0.98	0.97
TA0044	0.18	0.98	0.86
TA0045	1.3	1.1	0.37
TA0046	0.12	0.13	0.09
TA0049	0.78	0.83	0.83
TA0056	0.06	0.10	0.03
TA0073	0.76	0.86	0.83
TA0074	0.64	0.79	0.55
TA00168	1.1	0.79	0.15
TA00170	0.82	0.53	0.90
TA00171	0.72	0.79	0.81

بررسی فعالیت ضدمیکروبی نشان داد که سویه‌هایTA009 ، TA0044، TA0045، TA0046 و TA0049 بر علیه پاتوژن‌های آزمایش شده، اثر ضد میکروبی بهتری از خود نشان دادند و هاله‌های شفافی در اطراف چاهک‌ها ایجاد کردند. سویه-های TA00170 و TA00171 بر علیه *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* وباکتری TA0073 بر علیه *اشریشیا کولی* اثرات ضد میکروبی داشته اند . نمونه‌های TA0074 و TA00168 ، هیچ اثر ضد میکروبی بر علیه پاتوژن های آزمایش شده نشان نداده و فاقد هاله‌های شفاف اطراف چاهک بودند.

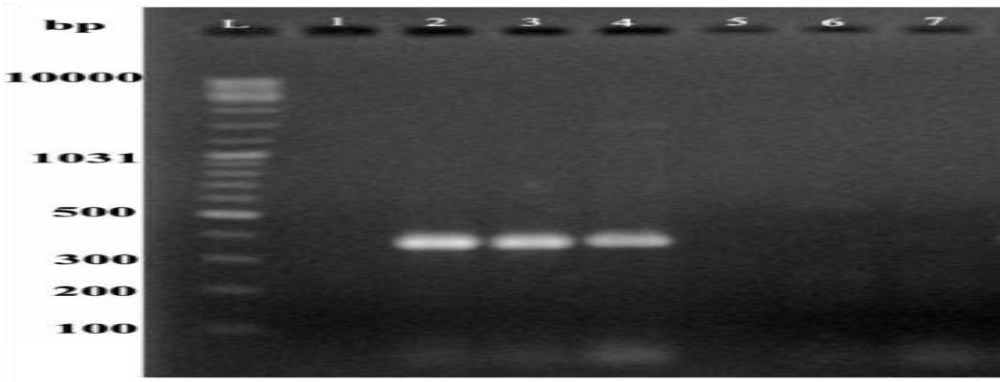
در بررسی مقاومت به آنتی بیوتیک ، به جز دو سویهTA0074 و TA0049، که به ترتیب به اریترومایسین و اگزالین مقاوم بودند، بقیه سویه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها حساسیت نشان دادند.

در بررسی خصوصیات ویرولانس، از ۱۱ سویه مورد مطالعه، ۴ سویه α و یا γهمولیتیک و مابقی β همولیتیک بودند. تنها سویه TA0049 ، قابلیت هیدرولیز DNAse را داشت. در آزمایشات فنوتیپی، ۷ سویه لسیتیناز مثبت بودند و مابقی سویه‌ها، ژلاتیناز، لیپاز و کوآگولاز منفی بودند(جدول ۵).

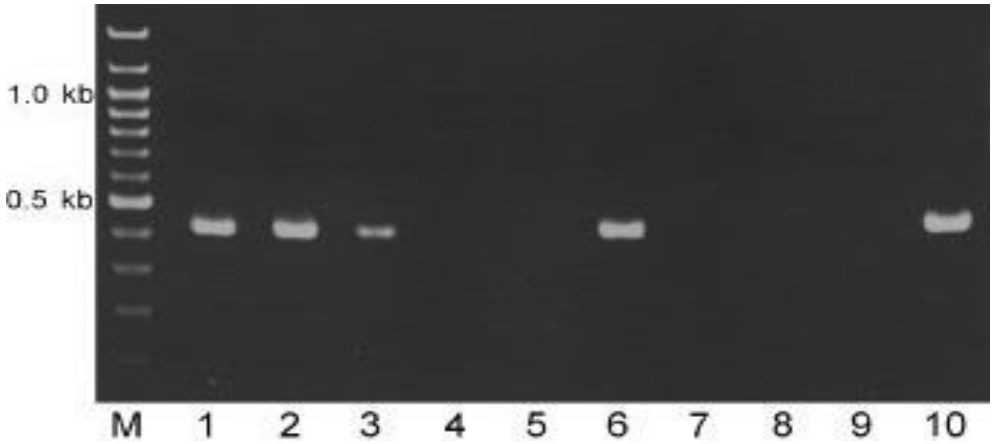
جدول ۵- فاکتورهای ویرولانسی فنوتیپی و ژنوتیپی باسیلوس

شماره نمونه	برچسب نمونه	باکتری های شناسایی شده	فاکتورهای بیماریزائی فنوتیپیک	فاکتورهای بیماریزائی ژنوتیپیک
۱	TA009	باسیلوس مگاتریوم	β همولیتیک، لسیتیناز+	-ve
۲	TA0044	باسیلوس سوبتیلیس	γ همولیتیک	*LipA*+,
۳	TA0045	باسیلوس سوبتیلیس	β همولیتیک، لسیتیناز+	-ve
۴	TA0046	باسیلوس سوبتیلیس	β همولیتیک، لسیتیناز+	*LipA*+,
۵	TA0049	باسیلوس سوبتیلیس	γ همولیتیک، DNAse+	*cytK* +
۶	TA0056	باسیلوس سوبتیلیس	β همولیتیک، لسیتیناز+	*cytK* +
۷	TA0073	باسیلوس سوبتیلیس	β همولیتیک، لسیتیناز+	*cytK* +
۸	TA0074	باسیلوس لشنی فورمیس	β همولیتیک، لسیتیناز+	-ve
۹	TA00168	باسیلوس سوبتیلیس	β همولیتیک، لسیتیناز+	*cytK* +
۱۰	TA00170	باسیلوس لشنی فورمیس	γ همولیتیک	-ve
۱۱	TA00171	باسیلوس سوبتیلیس	α همولیتیک	-ve

نمونه‌ها، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی جهت شناسایی فاکتورهای ویرولانسی مورد بررسی قرار گرفتند. از ۱۱ سویه ۹ سویه دارای ژن ویرولانس بودند.



شکل ۱- الگوی PCR با پرایمر *lipA*. L.مارکر، ۲.*باسیلوس سوبتیلیس* (نمونه شماره ۲)،۳.*باسیلوس سوبتیلیس* (نمونه شماره ۴)، ۴.کنترل مثبت (*استرپتوکوکوس آگالاکتیه*).



شکل ۲- الگوی PCR با پرایمر cytK. M.مارکر، ۱.*باسیلوس سوبتیلیس* (نمونه شماره ۵)، ۲.*باسیلوس سوبتیلیس* (نمونه ۶ شماره)، ۳.*باسیلوس سوبتیلیس* (نمونه شماره ۷)، ۶.*باسیلوس سوبتیلیس* (نمونه شماره ۹)، ۱۰.کنترل مثبت (*استرپتوکوکوس آگالاکتیه*).

سویه‌های شماره TA0049، TA0056، TA0073 و TA00168، دارای ژن ویرولانسی *cytK* و سویه‌های TA0044و TA0046، دارای ژن ویرولانسی *lipA* بودند. تنها دو سویه باسیلوس لشنی فورمیس و باسیلوس سوبتیلیس، فاقد ژن-های ویرولانس ذکر شده بودند و بعنوان باکتری پروبیوتیک دسته بندی شدند.

بحث

در حال حاضر سویه‌های *باسیلوس* در فرمولاسیون پروبیوتیک محصولات انسانی و دامی به بازار عرضه می‌شوند. *باسیلوس‌ها* به همراه سایر پروبیوتیک‌های تشکیل دهنده اسپور، سبب افزایش رشد گونه‌های *لاکتوباسیلوس* و جلوگیری از رشد میکروارگانیسم‌های مضر می‌گردند. استفاده از گونه‌های *باسیلوسی* مختلف در تغذیه انسان، مورد تائید اداره نظارت بر سلامت مواد غذائی می‌باشد (EFSA،۲۰۰۸). نتایج بدست آمده در مطالعه حاضر نشان دادند که حدود ۹۵٪ از ایزوله‌های مورد بررسی دارای مقاومت به اسید و نمک صفرا بودند، که از میان آن‌ها ۷۵٪ از ایزوله توانایی رشد و زنده مانی در pH های کمتر از ۴ و نمک صفرای حتی تا ۱٪ را داشتند. در میان نمونه‌ها، سویه‌های TA0046 (*باسیلوس سوبتیلیس*) و TA0056 (*باسیلوس سوبتیلیس*) بالاترین میزان مقاومت را از خود نشان دادند. Sushma و همکاران(۲۰۱۲) ، تاثیر pH های ۹-۵ را بر روی سویه‌های *باسیلوس سوبتیلیس* مورد بررسی قرار دادند و گزارش نمودند که این باکتری‌ها توانایی رشد در این محدوده pH را دارند وتوانایی رشد در pH های کمتر از این مقادیر را ندارند. در مطالعه‌ای، میزان رشد ۴۰ سویه *باسیلوس* در برابر غلظت های ۰/۰۰۵ تا ۰/۲ نمک صفرا، مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج نشان دادند که سویه‌های *باسیلوس سرئوس* و باسیلوس *مگاتریوم* ، تنها قادر به تحمل میزان ۰/۰۰۵ نمک صفرا بودند، درحالی که سویه-های *باسیلوس* در این پژوهش توانایی تحمل و رشد تا ۱٪ نمک صفرا را از خود نشان دادند. باکتری‌های پروبیوتیک برای اثر گذاشتن بر فلور میکروبی روده قادر به رقابت با پاتوژن‌ها از طریق تولید مواد ضد میکروبی می‌باشند(Kristoffersen و همکاران،۲۰۰۷). گزارش شده که سویه‌های *باسیلوس سوبتیلیس*، *باسیلوس مگاتریوم و باسیلوس تورنجنسیس* در برابر پاتوژن‌های *اشرشیا کلی و یرسینیا انتروکولیتیکا* اثر ضد میکروبی از خود نشان دادند(Aslim و همکاران ،۲۰۰۲).گروهی از محققین، اثر ضد

میکروبی *باسیلوس برویس* را در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس* بررسی کردند، این سویه نسبت به این پاتوژن با ایجاد هاله ۱۶ میلی‌متری حساسیت نشان داد(Mirac Yilmaz و همکاران،۲۰۰۶). گروهی نیز گزارش کردند که سویه *باسیلوس برویس* در برابر پاتوژن‌های *پسودوموناس آئروژینوزا*، *اشریشیا کلی* و *m.luteus* اثر ضد میکروبی داشته است(Perez و همکاران،۱۹۹۲). یکی از الزامات ایمنی برای باکتری‌های زنده که توسط انسان‌ها مصرف می‌شوند، عدم وجود هرگونه مقاومت اکتسابی آنتی بیوتیک‌ها و بررسی فاکتورهای ویرولانسی در آن‌ها می باشد. بنابراین، آنالیز مقاومت آنتی بیوتیکی و عدم وجود ژن-های ویرولانسی در سویه‌های پروبیوتیک حائز اهمیت است که یکی از ویژگی‌های فنوتیپی از یک گونه می باشد(Cutting ،۲۰۱۱; Hong و همکاران،۲۰۰۹).

در مطالعه حاضر، بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه‌های باسیلوس بر روی ۱۷ نوع آنتی بیوتیک متداول نشان داد که همگی در برابر آن‌ها حساسیت داشته و تنها سویه‌های TA0049 و TA0074 به ترتیب به آنتی بیوتیک‌های اگزالین و اریترومایسین مقاومت از خود نشان دادند. در مطالعه‌ای، تاثیر ۱۲ نوع آنتی بیوتیک را بر روی دو سویه *باسیلوس سوبتیلیس* و *باسیلوس مگاتریوم* بررسی کردند. نتایج این بررسی نشان داد که این دو سویه نسبت به آنتی بیوتیک‌های نووبیوسین، سفتیوفور، کلیندامایسین، اریترومایسین و باسیتراسین مقاوم و نسبت به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها (اسپکتینومایسین، تریپل سولفات، تتراسایکلین، ارمتوپریم، پنی سیلین، نئومایسین و جنتامایسین) حساس بودند(Galarza-Seeber1 و همکاران، ۲۰۱۵). گونه‌های مختلف جنس باسیلوس دارای ژن‌های ویرولانس (*hblA, hblC, hblD, bceT, Nhe, cytK, cse, lipA*) متعددی می باشند که عامل اصلی بیماری‌زایی در آن‌ها هستند(Rowan و همکاران،۲۰۰۱). داده‌های حاصل از آزمایش بیوشیمیایی سویه-های *باسیلوس* در برابر فعالیت همولیتیک نشان دادند که ۳۶٪ سویه‌ها فعالیت همولیتیک نداشتند و ۶۴٪ آن‌ها الگوی ناپیوسته‌ای از فعالیت همولیتیک از خود نشان دادند که پس از بررسی حضور یا عدم حضور ژن‌های همولیتیک، تمامی سویه‌ها فاقد این ژن بودند. حضور یک الگوی ناپیوسته همولیتیک معمولا مرتبط با حضور همولیزین BL در *باسیلوس‌ها* است(Beecher& Wong،۱۹۹۴). در حالی که در مطالعه حاضر، هر ۱۱ سویه دارای فعالیت همولیتیک به صورت α ، γ و یاβ بودند. در مطالعه دیگری نیز گزارش شده است که همه سویه‌ها به جز یکی از گونه‌های *باسیلوس سرئوس* که همگی مثبت بودند، فعالیت همولیتیک مهاری *hblA* را نشان دادند(Pruβ و همکاران،۱۹۹۹). گروهی از محققین در میان تمام گونه‌های *سرئوس* مورد بررسی، سه ژن *HBL* را با بیش از ۶۰٪ شباهت در الگوی ناپیوسته همولیتیک پیدا کردند(Thaenthanee و همکاران،۲۰۰۵). این نتایج تا حدودی با یافته‌های مطالعه حاضر شباهت داشت که نشان داد یک الگوی ناپیوسته از فعالیت همولیتیک مربوط به ژن *HBL* بود. برخلاف مشاهدات انجام شده در مطالعه حاضر، LÓPEZ و همکاران (۲۰۰۹)، نشان دادند که در سویه های *باسیلوس مگاتریوم* یک الگوی ناپیوسته از همولیزین حداقل در ۲ ژن وجود دارد. گروهی دیگر از محققین، وجود ژن *HBL* را در سویه‌های *باسیلوس سوبتلیس*، *باسیلوس لشنی فورمیس و باسیلوس تورنجنسیس* جدا شده از پنیر نشان دادند(Williams & Beattie ، ۱۹۹۹). در مطالعه حاضر، فعالیت کوآگولازی که به عنوان عاملی جهت تشکیل لخته نیز بررسی می‌شود در همه سویه‌های *باسیلوس* منفی بود. در مطالعات قبلی در مورد سویه‌های *باسیلوس* جدا شده از عسل، فعالیت کواگولازی را به عنوان عامل تشکیل لخته در ۷۴٪ از سویه‌ها از

مجموع ۵۳ سویه نشان داد(López و همکاران،۲۰۱۰)، اما سویه-های مورد بررسی در این مطالعه فاقد فاکتورهای لخته کننده و فعالیت کوآگولازی بودند. فعالیت کواگولاز به طور گسترده در *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد مطالعه قرار گرفته است که به عنوان یک فاکتور مهم در بیماری‌زایی آن در نظر گرفته می‌شود(Dingesو همکاران،۲۰۰۰; Guerrant و همکاران،۲۰۰۰) .در مطالعه حاضر مشخص شد، تمامی سویه‌های مورد بررسی فاقد کمپلکس NHE بودند. توزیع بالای این ژن‌ها در جمعیت *باسیلوس‌ها* از نمونه‌های روده دام و طیور با نتایج به دست آمده از سویه‌های *باسیلوس سرئوس* جدا شده از منابع مختلف از قبیل: Rowan و همکاران،۲۰۰۱ ; Beecher و همکاران، ۱۹۹۴ ; Ritmeester و همکاران،۲۰۰۱; Thaenthanee و همکاران،۲۰۰۵; Zahner و همکاران، ۲۰۰۵، مشابهت دارد. در این تحقیق مشخص شد که ۱۱٪ از سویه‌های مورد بررسی دارای ژن هیدرولیز کننده *LipA* بودند که نتایج حاصل از آزمایشات بیوشیمیائی نیز وجود این ژن را در این دو سویه نشان داد. مشابه این تحقیق نیز در سال ۲۰۱۰ انجام شد که بیان کردند، سویه‌های *باسیلوس سوبتیلیس* جدا شده از خاک مناطق ایران، دارای ژن ویرولانسی *lipA* می‌باشند(Mir Mohammad Sadeghi و همکاران، ۲۰۱۰). در پژوهش حاضر نیز مشاهده شد که دو سویه TA0044 و TA0046 نیز دارای ژن تجزیه کننده لیپاز می-باشند.حضور ژن انتروتوکسین T ، در هیچیک از نمونه‌های مورد بررسی *باسیلوس* مشاهده نشد، در حالی که دیگر پژوهشگران (Ritmeester و همکاران،۲۰۰۱; Guinebretière و همکاران ، ۲۰۰۲) گزارش کردندکه در بیشتر *باسیلوس‌ها* بخصوص *باسیلوس سرئوس*های جدا شده از مسمومیت‌های غذائی، شیوع ژن *bceT*، ۹۱٪ بوده که ۵۷٪ سویه‌ها مثبت بودند.همانند این تحقیق نیز توسط Rowan و همکاران در سال ۲۰۰۳ انجام شد و گزارش کردند۲ سویه *باسیلوس لشنی‌فورمیس* جدا شده از *fcs* جفت گاو و *fcs* ریه(جگر سفید) و یک سویه *باسیلوس سرئوس* جدا شده از شیر گاو فاقد ژن‌های *hbl* و*bceT* می‌باشند. حضور باند bp ۴۲۱ ژن *cytK* در ۳۶٪ از*باسیلوس*های شناسائی شده در مطالعه حاضر مشاهده شد، در حالی‌که در تحقیق دیگر نشان داده شده است ۹۲٪ از سویه‌های مورد بررسی حامل ژن *cytK* می‌باشند(Guinebretiere و همکاران، ۲۰۰۲). Rowan و همکاران (۲۰۰۱)، حضور ۲ ژن مرتبط با کمپلکس *HBL* و *bceT* را در یک *باسیلوس مگاتریوم* گزارش کردند. علاوه بر این، شیوع کمپلکس*HBL* در همه گونه‌های *باسیلوس سرئوس* تعیین شده است(Pruβ و همکاران ،۱۹۹۹)،اکثر سویه‌ها حامل ژن *hblA* بودند، اما حضور آن مربوط به یک گونه خاص و یا محیط خاص نمی‌شود.

نتیجه‌گیری

در پژوهش حاضر، ایمنی سویه‌های جنس *باسیلوس* جدا شده از مرغ گوشتی و زنبور عسل به عنوان پروبیوتیک با استفاده ازتجزیه و تحلیل بیوشیمیائی و مولکولی تائید گردید. باکتری‌های *باسیلوس* جدا شده در این مطالعه دارای خواص پروبیوتیکی بوده و می‌توانند در آینده به عنوان پروبیوتیک در محصولات انسانی و حیوانی مورد استفاده قرار گیرند. در ایران نیز استفاده از پروبیوتیک‌ها رو به گسترش است و شناسائی و ارائه باکتری‌های *باسیلوس* پروبیوتیکی بومی می‌تواند در بهبود زنجیره غذائی کشور موثر باشد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از شرکت فن آوری زیستی طبیعت گرا که هزینه های لازم جهت انجام این پروژه را تامین نمودند تشکر و قدردانی می گردد.

منابع

استاندارد ملی ایران.(۱۳۹۲).شماره ۱۹۴۵۹، میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک، ویژگی‌ها و روش‌های آزمون(برون تن). چاپ اول. صفحات۱۹-۱.

مژگانی،ن.(۱۳۹۵). تولید نیمه صنعتی مکمل غذایی طیور با استفاده از سویه های پروبیوتیکی بومی و گیاهان داروئی.گزارش نهائی طرح تحقیقاتی،صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور.

Anderson, JW., Gilliland, SE.(1999). Effect of fermented milk (yogurt) containing *Lactobacillus acidophilus* L1 on serum cholesterol in hypercholesterolemic humans. *J Am Coll Nutr*. 18(1):43–50.

Aslim, B., Sağlamn,N., Beyatli Y.(2002). Determination of some properties of *Bacillus* isolated from soil. *Turkish Journal of Biology*. 26(1):41-8.

Beecher, DJ., Wong, A.(1994). Identification of hemolysin BL-producing *Bacillus cereus* isolates by a discontinuous hemolytic pattern in blood agar. *Applied and environmental microbiology*. 60(5):1646-51.

Beattie, S., Williams, A. (1999).Detection of toxigenic strains of *Bacillus cereus* and other *Bacillus spp*. with an improved cytotoxicity assay. *Letters in Applied Microbiology*. 28(3):221-5.

Braide, W., Nwaoguikpe, R., Oranusi, S., Udegbunam, L., Akobondu, C., Okorondu, S.(2011) .The effect of biodeterioration on the nutritional composition and microbiology of an edible long-winged reproductive termite, Macroterms bellicosus. Smeathman. *Internet Journal of Food Safety*.(13):107-14.

Buntin, N., Chanthachum, S and Hongpattarakere, T. (2008). Screening of lactic acid bacteria from gastrointestinal tracts of marine fish for their potential use as probiotics. *Songklanakarin Journal of Science & Technology*. 30.

Cheigh, CI., Choi, HJ., Park, H., Kim, SB., Kook, MC., Kim, TS., Hwang, JK. and Pyun, YR.(2002).Influence of growth conditions on the production of a nisin-like Bacteriocin by *Lactoccus lactis subsp.lactis A164* isolated from Kimchi. *J.of Biotechnology*. (95): 225-235.

Chesson, A., Franklin, A., Aumaître, A., Sköld, O., Leclercq, R., von Wright, A. (2002).Opinion of the scientific committee on animal nutrition on the criteria for assessing the safety of microorganisms resistant to antibiotics of human and veterinary importance. Directorate C—Scientific Opinions European Commission Health and Consumer Protection Directorate-General, Brussels, Belgium.

Cutting, SM.(2011). *Bacillus* probiotics. *Food Microbiology*. 28(2):214-20.

Dinges, MM., Orwin, PM., Schlievert, PM.(2000). Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical microbiology reviews*. 13(1):16-34.

EFSA.(2008). Update of the criteria used in the assessment of bacterial resistance to antibiotics of human or veterinary importance. The J Europ Food Safety Assoc. 732:1–15.

Flahaut, S., Hartke, A., Giard, JC., Benachour, A., Boutibonnes, P., Auffray, Y. (1996). Relationship between stress response towards bile salts, acid and heat treatment in *Enterococcus faecalis*. *FEMS microbiology letters*. 138(1): 49-54.

Hong, HA., Khaneja, R., Tam, NM., Cazzato, A., Tan, S., Urdaci, M.(2009). *Bacillus subtilis* isolated from the human gastrointestinal tract. *Research in microbiology*.160(2):134-43.

Hosoi, T., Ametani, A., Kiuchi, K., Kaminogawa, S.(1999). Changes in fecal microflora induced by intubation of mice with *Bacillus subtilis* (natto) spores are dependent upon dietary components. *Canadian journal of microbiology*. 45(1):59-66.

Jiang,H., Dong,H., Zhang, G., Yu,B., Chapman,L.R. and Fields, M.W.(2006). Microbial diversity in water and sediment of Lake Chaka, an athalassohaline lake in northwestern China. *Applied and environmental microbiology* .72(6): 3832-3845.

Kristoffersen, SM., Ravnum, S., Tourasse, NJ., Økstad, O.A., Kolstø, A.B., Davies, W.(2007). Low concentrations of bile salts induce stress responses and reduce motility in *Bacillus cereus ATCC 14570*. *Journal of bacteriology*.189(14):5302-13.

López, A., Alippi, A.(2010). Enterotoxigenic gene profiles of *Bacillus cereus* and *Bacillus megaterium* isolates recovered from honey. *Rev Argent Microbiol*. 42(3):216-25.

López, AC., Alippi, AM.(2009). Diversity of *Bacillus* megaterium isolates cultured from honeys. *LWT-Food Science and Technology*. 42(1):212-9.

Mir Mohammad Sadeghi, H., Rabbani, M., Moazen, F., Homami, S.(2010). Molecular detection of lipase A gene in putative *Bacillus subtilis* strains isolated from soil. *Iranian Journal of Biotechnology*. 8(1):46-9.

Osipova, I., Sorokulova, I., Tereshkina, N., Grigor'eva, L. (1997). Safety of bacteria of the genus *Bacillus*, forming the base of some probiotics. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii, i immunobiologii*. (6):68-70.

Foulquié Moreno, M. R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E.and De Vuyst, L. (2006).The role and application of enterococci in food and health. International *Journalof Food Microbiology*. 106, 1e24.

Galarza-Seeber, R., Latorre, JD., Hernandez-Velasco, X., Wolfenden, AD., Bielke, LR., Menconi, A. (2015). Isolation, screening and identification of *Bacillus spp*. as direct-fed microbial candidates for aflatoxin B1 biodegradation. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*.5(9):702-6.

Gerald, BL., Perkin, JE. (2003). Position of the American Dietetic Association: Food and water safety. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*.103(9):1203.

Gopal, A., Shah, N. P. and Roginski, H.(1996). Bile tolerance, taurocholate deconjugation and cholesterol removal by *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium spp*. Milchwissenschaft. 51:619-623

Guerrant, R., Bobak, D.(2000). Nausea, vomiting, and noninflammatory diarrhea. Principles and Practice of Infectious Diseases. 4:965-73.

Guinebretière, M-H., Broussolle, V.(2002).Enterotoxigenic profiles of food-poisoning and food-borne *Bacillus cereus* strains. *Journal of Clinical Microbiology*. 40(8):3053-6.

Hoa, NT., Baccigalupi, L., Huxham, A., Smertenko, A., Van, PH., Ammendola S. (2000). Characterization of *Bacillus* species used for oral bacteriotherapy and bacterioprophylaxis of gastrointestinal disorders. *Applied and environmental microbiology*. 66(12):5241-7.

formulae. *Applied and environmental microbiology*. 67(9):3873-81.

Rowan, NJ., Caldow, G., Gemmell, CG., Hunter, IS.(2003). Production of diarrheal enterotoxins and other potential virulence factors by veterinary isolates of *Bacillus species* associated with nongastrointestinal infections. *Applied and environmental microbiology*. 69(4):2372-6.

Sanders, ME. (1999). Probiotics. *Food technology*.53(11):67-77.

Semedo, T., Santos, MA., Martins, P., Lopes, MFS., Marques, JJF., Tenreiro, R.(2003). Comparative study using type strains and clinical and food isolates to examine hemolytic activity and occurrence of the cyl operon in *enterococci*. *Journal of Clinical Microbiology*. 41(6):2569-76

Sorokulova, I. (2014). Modern status and perspectives of *Bacillus* bacteria as probiotics. *Journal of Probiotics & Health.* 1(4): e106.

Sushma, K., Abha, S., Chander P.(2012). Isolation and Characterization of *Bacillus subtilis KC3* for amylolytic activity. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*. 2(5):336.

Thaenthanee, S., Wong, A.C.L., Panbangred, W.(2005). Phenotypic and genotypic comparisons reveal a broad distribution and heterogeneity of hemolysin BL genes among *Bacillus cereus* isolates. *International journal of food microbiology*. 105(2):203-12.

Yilmaz, M., Soran, H., Beyatli, Y. (2006). Antimicrobial activities of some *Bacillus spp*. strains isolated from the soil. *Microbiological Research. 161(2):127-31.*

Perez, C., Suarez, C., Castro, GR. (1992). Production of antimicrobials by *Bacillus subtilis* MIR 15. *Journal of biotechnology*. 26(2-3):331-6.

Prüß, BM., Dietrich, R., Nibler, B., Märtlbauer, E., Scherer, S.(1999). The Hemolytic Enterotoxin HBL Is Broadly Distributed among Species of the *Bacillus cereus* Group. *Applied and Environmental Microbiology*. 65(12):5436-42.

Rabbani, M., Shafiee, F., Shayegh,Z., MirMohammadSadeghi,H., Samsam Shariat,Z.,Etemadifar,Z. and Moazen, F.(2015). Isolation and Characterization of a New Thermoalkalophilic Lipase from Soil Bacteria. *Iranian journal of pharmaceutical research*: IJPR 14(3): 901.

Razmgah,N., , Mojgani,N., and Karimi Torshizi,M.A.(2016). Probiotic Potential and Virulence Traits of Bacillus and Lactobacillus Species Isolated from Local Honey Samples in Iran. *Journal of Pharmacy and Biological Sciences*. Volume 11, Issue 4 Ver. I, PP 00-00.

Ritmeester, WS., Delfgou-van Asch, EH., Dufrenne, JB., Wernars, K., Smit, E., van Leusden, FM. (2001).Detection of genes encoding for enterotoxins and determination of the production of enterotoxins by HBL blood plates and immunoassays of psychrotrophic strains of *Bacillus cereus* isolated from pasteurised milk. *International journal of food microbiology*. 64(1):63-70.

Rolfe, RD.(2000). The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *The Journal of nutrition*.130(2):396S-402S.

Rowan, NJ., Deans, K., Anderson, JG., Gemmell, CG., Hunter, IS., Chaithong, T.(2001). Putative virulence factor expression by clinical and food isolates of *Bacillus spp*. after growth in reconstituted infant milk

Zahner, V., Cabral, DA., Régua-Mangia, AH., Rabinovitch, L., Moreau, G., McIntosh, D. (2005). Distribution of genes encoding putative virulence factors and fragment length polymorphisms in the vrrA gene among Brazilian isolates of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *Applied and environmental microbiology*. 71(12):8107-14.

https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi