Isolation and Biochemical and Molecular Identification of *Lactobacillus Plantarum* Bacteria from Rhizosphere of Lenjan Rice

Sabere Nouri
Msc Student, Dept. of Biotechnology, Fac. of Agricuture, Bu-Ali Sina Un., sabere.nuri@yahoo.com
Sonbol Nazeri *
Assistant Professor, Dept. of Biotechnology, Fac. of Agricuture, Bu-Ali Sina Un., snblnazeri@yahoo.com
Parham Hosseyni
Msc Student, Dept. of Biochemistry, Otago Un. (New Zealand), parham.hosseini@otago.ac.nz

Abstract

Introduction: Probiotics refers to a group of living microorganisms that have beneficial effects on host health. *Lactobacilli* are one of the most important probiotic bacteria. The stimulatory effects of the immune system, besides reduction of gastrointestinal infections and the risk of inflammation of intestines in humans and animals, are some of Lacobacillus benefits. The effect of rhizospher bacteria, like *Lactobacillus*, on production of plant hormones, dissolving plant nutrient, facilitates the absorption of nutrients (like nitrogen), and the reduction of plant diseases were reported. Isolation of *Lactobacillus* has been reported of various sources of dairy and non-dairy sources. The purpose of this study was to investigate the presence of *L. plantarum*, one of most important probiotic bacteria, in rice rhizosphere, along with examination of the morphological, molecular, biochemical and probiotic properties of the isolated microorganisms.

Materials and Methods: Sampling of rhizosphere rice variety was carried out in Lenjan (Lenjan, Isfahan) carried out. Dillutions of samples were transferred to MES medium. Biochemical test, as sugar fermentation and enzyme activity, performed on gram-positive isolate bacilli. The ability of bacteria to grow in presence of Bile salt, and different pH and temperatures was investigated. Antibiotic resistance of isolates was examined. Specific primers of *L. plantarum* was used for molecular identification.

Results: Of 16 microorganisms, isolated from the rice's rhizosphere, there were 10 bacillus-shaped bacteria, which eight gram-positive isolates were oxidase and catalase negative (characteristic of *Lactobacillus* species). Sugar fermentation experiments identified six isolates with *L. plantarum* characteristics. Molecular experiments with the specific primers of *L. plantarum* confirmed the results. The bacteria grew very well (similar to control samples) in acidic medium at pH 3.5, 40ºC, and in presence of 0.3% bile. Resistance to seven of 12 antibiotics was detected.

Discussion and conclusion: The present study showed that rhizosphere of rice is the natural source for isolation of *L. plantarum*.

Key words: Probiotic, *Lactobacillus plantarum*, Rhizosphere, Lenjan Rice, Antibiotic Resistance.

* Corresponding author
Received: March 10, 2018 / **Accepted:** June 27, 2018

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال هفتم، شماره ۲۷، پاییز ۱۳۹۷، صفحه ۷۱- ۶۱
تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۲/۱۹ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۴/۰۶

جداسازی و شناسایی بیوشیمیایی و مولکولی باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* از ریزوسفر ریشهٔ برنج لنجان

صابره نوری: کارشناس ارشد گروه بیوتکنولوژی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه بوعلی‌سینا، همدان، ایران، sabere.nuri@yahoo.com
سنبل ناظری *: استادیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه بوعلی‌سینا، همدان، ایران، snblnazeri@yahoo.com
پرهام حسینی: مربی گروه بیوشیمی، دانشگاه اوتاگو، نیوزیلند، parham.hosseini@otago.ac.nz

چکیده

مقدمه: پروبیوتیک به گروهی از ریزموجودات زنده اطلاق می‌شود که آثار سودمندی بر سلامتی میزبان دارند. لاکتوباسیلوسها از مهم‌ترین باکتری‌های پروبیوتیک هستند. تحریک‌کنندگی سیستم ایمنی و کاهش عفونت دستگاه گوارش و خطر بیماری التهاب روده‌ای با تولید ترکیبات ضدمیکروبی ازجمله آثار مفید لاکتوباسیلوس‌ها در انسان و حیوان هستند. اثر باکتری‌های ریزوسفر خاک مانند لاکتوباسیلوس‌ها در تولید هورمون، انحلال ترکیبات غذایی گیاهی، تسهیل جذب مواد غذایی نظیر نیتروژن و کاهش بیماری‌های گیاهی گزارش شده است. جداسازی لاکتوباسیل‌ها از منابع مختلف لبنی و غیرلبنی گزارش شده است. هدف پژوهش حاضر بررسی حضور لاکتوباسیلوس پلانتاروم، یکی از مهم‌ترین باکتری‌های پروبیوتیک، در ریزوسفر گیاه برنج و مطالعهٔ ویژگی‌های مولکولی، بیوشیمیایی و پروبیوتیکی این ریزموجود است.

مواد و روش‌ها: نمونه‌برداری از ریزوسفر برنج رقم لنجان (منطقهٔ لنجان، اصفهان) انجام شد. رقت‌های صفر تا 10^{-4} از نمونه به محیط MRS منتقل و آزمایش‌های بیوشیمیایی شامل تخمیر قندها و فعالیت آنزیمی روی جدایه‌های باسیلی‌شکل گرم مثبت انجام شدند. توانایی رشد جدایه‌ها در حضور نمک صفراوی و اسیدیته‌ها و دماهای مختلف بررسی و سپس، مقاومت جدایه‌ها به آنتی‌بیوتیک مطالعه شد. آغازگر اختصاصی لاکتوباسیلوس پلانتاروم برای شناسایی مولکولی استفاده شد.

نتایج: از بین ۱۶ ریزموجود جداشده از ریزوسفر گیاه مطالعه‌شده، ۱۰ باکتری باسیلی‌شکل و ۸ جدایه گرم مثبت، اکسیداز و کاتالاز منفی (ویژگی لاکتوباسیلوس‌ها) بودند. آزمایش‌های تخمیر قند، ۶ جدایه را با ویژگی لاکتوباسیلوس پلانتاروم مشخص کردند. استفاده از آغازگرهای اختصاصی لاکتوباسیلوس پلانتاروم این نتایج را تأیید کرد. این باکتری‌ها در محیط اسیدی با اسیدیتهٔ برابر ۳/۵، دمای ۴۰ درجهٔ سانتی‌گراد و حضور ۰/۳ درصد صفرا به‌خوبی (مشابه نمونه‌های شاهد) رشد کردند. باکتری‌ها به ۷ آنتی‌بیوتیک از ۱۲ آنتی‌بیوتیک بررسی‌شده مقاومت نشان دادند.

بحث و نتیجه‌گیری: پژوهش حاضر نشان داد ریزوسفر برنج منبعی طبیعی برای جداسازی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* است.

واژه‌های کلیدی: پروبیوتیک، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، ریزوسفر، برنج لنجان، مقاومت به آنتی‌بیوتیک

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات

Copyright©2018, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

واژهٔ پروبیوتیک[1] از واژهٔ یونانی پروبیوس به معنای حیات‌بخش یا زیست‌بخش گرفته شده است. نخستین‌بار، لیلی[2] و استیلول[3] در سال ۱۹۶۵ این واژه را با مفهوم متفاوتی از مفهوم امروزی تعریف کردند و پروبیوتیک‌ها را عوامل تحریک‌کنندهٔ رشد دانستند که از ریزموجودات ترشح می‌شوند و باعث تحریک رشد سایر ریزموجودات می‌شوند. در تعریف کنونی، پروبیوتیک‌ها ریزموجودات زنده‌ای تعریف می‌شوند که با فعالیت زیستی خود در روده و یا هر اندام دارای پوشش مخاطی در حفظ توازن فلور میکروبی سودمند هستند و نقش مثبتی در سلامت میزبان (انسان و حیوان) ایفا می‌کنند (۱). پروکاریوت‌هایی که رشد گیاه را بهبود می‌بخشند یا از بیماری‌های گیاهی جلوگیری می‌کنند با عنوان PGPB[4] (باکتری‌های القاکنندهٔ رشد) یا PPB[5] (باکتری‌های پروبیوتیک گیاهی) شناخته می‌شوند (۲). هاس[6] و همکاران و پس‌ازآن، پیکارد[7] و همکاران اصطلاح پروبیوتیک را برای این دسته از باکتری‌های گیاهی به کار بردند (۳ و ۴). این باکتری‌ها YIB[8] (باکتری‌های افزایش‌دهندهٔ عملکرد) نیز نامیده می‌شوند (۲). *لاکتوباسیلوس*‌ها با گونه‌های متعدد یکی از مهم‌ترین جنس‌های باکتری‌های پروبیوتیک هستند و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*‌ها یکی از مهم‌ترین این باکتری‌ها به شمار می‌روند. علاوه‌بر جنبه‌های مختلف *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در سلامتی انسان و حیوان و نیز صنعت، این باکتری به‌علت داشتن توانایی زیاد در سازگار و منطبق‌شدن با نیچ‌های متفاوت درخور توجه است (۵). *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*‌ها ازنظر ریخت‌شناسی باکتری‌های میله‌ای‌شکل با انتهای گرد هستند، آرایش سلولی آنها به‌شکل منفرد، جفتی و زنجیره‌های کوتاه است، از گروه ریزموجودات بی‌هوازی اختیاری هستند و کلنی آنها ازنظر شکل ظاهری گرد و صاف و سفید یا زرد است (۵).

مصرف فراورده‌های غذایی حاوی پروبیوتیک‌ها در انسان و دام آثار مختلفی بر سلامت دارد که کاهش عفونت دستگاه گوارش و خطر بیماری التهاب روده‌ای و آثار تحریک‌کنندهٔ سیستم ایمنی ازجملهٔ این آثار هستند. تولید ترکیبات آنتی‌بیوتیکی توسط این باکتری‌ها به‌ویژه به‌علت بروز مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در ریزموجودات بیماری‌زا که مشکلات عدیده‌ای در درمان بیماری ایجاد می‌کند، یکی از دلایل عمدهٔ جداسازی این ریزموجودات از منابع مختلف است (۶).

مطالعه‌ها نشان داده‌اند باکتری‌های ریزوسفر خاک (ازجمله *لاکتوباسیلوس*‌ها) به‌شکل‌های مختلفی در رشد و سلامت گیاه مؤثر هستند (۷). ریزموجودات ریزوسفر با فراهم‌کردن مواد غذایی، فیتوهورمون‌ها، ترکیبات سرکوب‌کنندهٔ بیماری‌زاها یا افزایش مقاومت در برابر تنش‌های زیستی مانند گرما، شوری و خشکی آثار بسیار مفیدی بر رشد و سلامت گیاهان دارند (۳ و ۸). اگرچه باکتری‌ها در همهٔ اجزای گیاه زندگی می‌کنند، بسیاری از آنها به‌طور سنتی از بافت زیرزمینی و ریزوسفر به دست می‌آیند (۹). ویژگی نمونه‌های ریزوسفری برای جداسازی باکتری‌های پروبیوتیک گیاهی، تماس مستقیم آنها با گیاه و خاک است (۱۰). باکتری‌های پروبیوتیک درشت‌مغذی‌ها و ریزمغذی‌های لازم برای گیاه را تأمین می‌کنند؛ از سوی دیگر، آنها کربوهیدرات‌های مختلف، آمینواسیدها، اسیدهای آلی (ترشح‌شده از ریشه) و سایر ترکیبات موجود در ریزوسفر را متابولیزه می‌کنند. باکتری‌ها از طریق آزادسازی فسفر ترکیبات آلی مانند فیتات به تغذیهٔ گیاه کمک می‌کنند و رشد گیاه را

به‌طور غیرمستقیم افزایش می‌دهند؛ علاوه‌براین، پروبیوتیک فعالیت ریزموجودات بیماری‌زا را از طریق آنتاگونیسم‌های میکروبی کاهش می‌دهد و با فعال‌سازی گیاه برای حفاظت بهتر از خود باعث پدیدهٔ «مقاومت سیستمیک القاشده» می‌شود (۸-۱۱). نشان داده شده است *لاکتوباسیلوس*ها در مهار قارچ‌های میکروسکوپی ازجمله *Penicillium expansum*، *Botrytis cinerea*، *Aspergillus niger*، *Aspergillus flavus* و *Fusarium graminarum* و باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی ازجمله *Xanthomonas campestris* و *Erwinia carotovora* کارآمد هستند (۲ و ۱۰). این باکتری‌ها در تجزیهٔ زیستی آلاینده‌های محیطی[۹] و تولید مواد کلاته‌کنندهٔ فلزهای سنگین و کاهش سمیت فلزهای سنگین[۱۰] نقش دارند (۲).

باکتری‌های لاکتیک‌اسید در صنعت به‌علت فیزیولوژی ویژه و ویژگی‌های بیوشیمیایی مانند تولید اگزوپلی‌ساکاریدها، اسیدهای آلی، ترکیبات معطر، تحمل فعالیت آبی کم و تولید مواد ضدمیکروبی درخور توجه هستند و کاربردهای مختلفی یافته‌اند؛ ازجمله، در بررسی‌ها نشان داده شده است برخی سویه‌های باکتری‌های لاکتوباسیل قادر به مهار بیماری‌زاهای خوراکی مانند *Listeria monocytogenes*، *Escherichia coli*، *Salmonella typhimurium* و *Staphylococcus aureus* هستند. باتوجه‌به مشکلات آلودگی‌های میکروبی به یافته‌هایی از این قبیل در صنایع غذایی بسیار توجه شده است (۱۰).

برنج (*Oryza sativa*) با بسیاری از محصولات متفاوت است؛ زیرا معمولاً در خاک سیلاب کشت می‌شود و در نتیجه، محیط اکسیژنیک و غیراکسیژنیک درون ریزوسفر برنج گروه فیزیولوژیکی ویژه‌ای از ریزموجودات دارای هر دو نوع متابولیسم هوازی و غیرهوازی را انتخاب می‌کند (۱۲). واریتهٔ برنج لنجان یکی از انواع برنج‌های ایران است که در منطقهٔ لنجانات (در فاصلهٔ ۵۰ کیلومتری جنوب‌غربی اصفهان) کشت می‌شود. این خطه به‌علت آب‌وهوای مناسب و خاک غنی از درشت‌مغذی‌ها و ریزمغذی‌ها ازنظر کشاورزی مهم‌ترین تولیدکنندهٔ برنج در استان اصفهان به شمار می‌آید و واریتهٔ برنج لنجان از برنج‌های محبوب ایرانیان محسوب می‌شود. در چند مطالعهٔ انجام‌شده، حضور فلزهای سنگینی مانند کروم، سرب و کادمیوم در محیط کشت برنج لنجان گزارش شده است (۱۳ و ۱۴).

شناسایی *لاکتوباسیلوس*ها با روش‌های معمول بیوشیمیایی و مولکولی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی انجام می‌شود. پژوهش‌ها نشان داده‌اند وقتی سوش‌های *لاکتوباسیلوس* (در گونه‌های بسیار نزدیک به هم) توالی نوکلئوتیدی ژن *16S rRNA* مشابهی دارند، تعیین توالی نوکلئوتیدی محصولات همانندسازی ژن‌های کدکنندهٔ پروتئین‌های اختصاصی مانند RecA[۱۱] تفاوت‌های لازم برای جداکردن آنها را فراهم می‌کند. پروتئین RecA پروتئین فعالی در سلول‌های پروکاریوت است که وظایف چندگانه‌ای در سلول باکتری ایفا می‌کند. پروتئین RecA پروتئین کوچکی است که عملکردهای مختلف آن در اتصال DNA (تک‌رشته و دورشته)، جفت‌شدن و تبادل هومولوگ DNA و هیدرولیز ATP اثبات شده است. پژوهشگران آغازگر اختصاصی ژن *recA* را در بررسی گونه‌های مختلف *لاکتوباسیلوس* به‌ویژه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* استفاده و تأیید کرده‌اند (۱۵).

باتوجه‌به اهمیت ریزموجودات خاک و ریزوسفر ریشه به‌ویژه *لاکتوباسیلوس*ها در رشدونمو گیاهان و نیز

کمک به رویارویی با تنش‌های محیطی ازجمله حضور فلزهای سنگین و همچنین اهمیت آنها در صنایع غذایی و بخش پزشکی، پژوهش حاضر با هدف اولیهٔ بررسی حضور *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در ریزوسفر برنج لنجان انجام شد.

مواد و روش‌ها.

جمع‌آوری و آماده‌سازی نمونه‌ها: چهار نمونه از ریزوسفر برنج لنجان مزارع برنج واقع در خطهٔ نکوآباد اصفهان (در موقعیت ۳۲ درجه و ۲۲ دقیقهٔ عرض شمالی و ۵۱ درجه و ۳۱ دقیقهٔ شرقی) جمع‌آوری و به آزمایشگاه فناوری دانشگاه بوعلی‌سینای همدان منتقل شدند. سری‌های رقت (رقت‌های صفر تا 10^{-4}) از نمونه‌ها در سرم فیزیولوژی استریل تهیه شدند.

کشت و گرماگذاری نمونه‌ها: ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های مختلف نمونه‌ها با پیپت پاستور روی محیط کشت MRS[12] (مناسب برای رشد باکتری‌های پروبیوتیک به‌ویژه *لاکتوباسیلوس*ها) کشت داده شد و به‌مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد گرماگذاری شد (۱۶).

.بررسی ویژگی‌های ریخت‌شناسی و بیوشیمیایی: ویژگی‌های ظاهری هر کلنی و سلول با میکروسکوپ نوری و پس‌از رنگ‌آمیزی گرم بررسی و ثبت شدند. از کلنی‌های مشابه *لاکتوباسیلوس* با ویژگی باکتریایی میله‌ای‌شکل، گرم مثبت و بدون اسپور برای انجام آزمون بیوشیمیایی و تأیید مولکولی گونهٔ *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* نمونه‌برداری شد. برای تأیید خلوص باکتری، هر سویه چند بار در محیط MRS واکشت شد. آزمون‌های اکسیداز و کاتالاز در کشت این باکتری‌ها انجام شدند؛ در آزمون کاتالاز، محیط کشت بدون باکتری برای شاهد منفی و باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* برای شاهد مثبت و در آزمون اکسیداز، *استافیلوکوکوس اورئوس* برای شاهد مثبت و *استرپتوکوک پنومونیا* برای شاهد منفی استفاده شد (۱۶).

تولید اسید از قندها با به‌کارگیری محیط MRS بدون عصارهٔ گوشت و گلوکز انجام شد؛ به این منظور، در هر لولهٔ آزمایش (دارای لولهٔ دورهام) ۲ میلی‌لیتر محیط MRSمایع مخصوص تخمیر (حاوی ۱ درصد قند مدنظر) و معرف فنل‌رد ریخته شد. پس‌از تلقیح ۱ درصد از کشت فعال جدایهٔ باکتری موردشناسایی، لوله‌ها به‌مدت ۷۲ ساعت تا یک هفته در انکوباتور ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد و در شرایط ۵ درصد گاز دی‌اکسیدکربن نگهداری شدند. تبدیل رنگ قرمز محیط به رنگ زرد به معنای مصرف قند و تولید اسید تلقی شد (قند گلوکز برای شاهد در نظر گرفته شد) (۱۷).

ارزیابی ویژگی‌های پروبیوتیکی: ازآنجاکه توانایی رشد باکتری‌های پروبیوتیک در شرایط مختلف ازجمله اسیدیته، دما و حضور نمک برای استفاده در صنعت (ازجمله صنایع غذایی و کشاورزی) و نیز شرایط رشدی در بدن (انسان و حیوانات) بسیار مهم است، آزمایش‌هایی طراحی شدند. توانایی رشد باکتری‌ها در شرایط اسیدی با استفاده از محیط MRS با اسیدیته‌های مختلف (۳/۵، ۴، ۴/۵ و ۵) آزمایش شد. توانایی بقای باکتری‌ها در محیط‌های صفراوی با استفاده از محیط MRS حاوی ۰/۳ و ۰/۵ درصد اکس‌گال[13] ارزیابی شد. برای انجام این آزمایش‌ها، ابتدا کشت فعال از هر ذخیرهٔ باکتریایی تهیه و به نسبت ۱ درصد به محیط کشت مایع موردآزمایش اضافه شد. محیط کشت‌ها به‌مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد گرماگذاری

شدند. توانایی رشد جدایه‌های مطالعه‌شده در محیط‌های یادشده با مشاهدهٔ تغییر کدورت پس‌از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بررسی و نتایج به‌شکل مثبت یا منفی تعیین شد (۱۸). توانایی رشد جدایه‌های *لاکتوباسیلوس*‌ها در دماهای ۱۵، ۲۰، ۴۰ و ۴۵ درجهٔ سانتی‌گراد و در غلظت‌های نمک (NaCl) ۴/۵ و ۶/۵ درصد نیز بررسی شد. همچنین توانایی این ریزموجودات برای احیای نیترات پیگیری شد (۱۹). در آزمایش‌ها، میزان رشد طی مدت ۲۴ ساعت یا بیشتر با بررسی کدورت رشد باکتری (OD_{600}) بررسی شد. نمونه‌ها هر یک ساعت یک بار طی شش ساعت اول و سپس در انتهای ۲۴ ساعت بررسی شدند. پس‌از ۲۴ ساعت، کدورت بیش از ۲/۸ رشد مناسب و کدورت کمتر از ۰/۸ رشد ضعیف در نظر گرفته شد.

محافظت فلور میکروبی دستگاه گوارش پس‌از درمان با آنتی‌بیوتیک یکی از فواید استفاده از باکتری‌های پروبیوتیک مقاوم به آنتی‌بیوتیک است (۲۰)؛ ازاین‌رو، مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در برابر آنتی‌بیوتیک‌های مختلف بررسی شد. آزمایش بر اساس روش سبسی[۱۴] و همکاران (۲۰۰۳) انجام شد. ۲۰۰ میکرولیتر از کشت غنی‌شده به ۴ میلی‌لیتر محیط‌کشت MRS آگار (۱ درصد آگار) اضافه شد. دیسک‌های آنتی‌بیوتیک در سطح محیط قرار گرفتند و قطر هالهٔ بازدارندگی رشد اطراف دیسک‌ها در پلیت‌ها پس‌از ۲۴ ساعت گرماگذاری در ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد. دیسک‌های آنتی‌بیوتیک شامل تتراسیکلین (۳۰ میکروگرم)، ونکومایسین (۳۰ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، پنی‌سیلین (۱۰ میکروگرم)، آموکسیکلاو (۳۰ میکروگرم)، سفتریاکسون (۳۰ میکروگرم)، اریترومایسین (۱۵ میکروگرم)، نالیدیکسیک اسید (۳۰ میکروگرم)، توبرامایسین (۱۰ میکروگرم)، ریفامپیسین (۵ میکروگرم)، اوفلوکساسین (۵ میکروگرم)، تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم) بودند. هالهٔ بازدارندگی کمتر از ۹ میلی‌متر مقاوم در نظر گرفته شد (۲۱ و ۲۲).

شناسایی مولکولی: DNA باکتری به روش موری[۱۵] و تامسون[۱۶] با اندکی تغییر خالص شد (۲۳). در این روش، ۱۰ میلی‌لیتر سوپانسیون باکتریایی از کشت ۲۴ساعته با سرعت ۱۳۰۰۰ دوردردقیقه به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب به درون ویال‌های جدید منتقل و ۱ میلی‌لیتر بافر لیزکنندهٔ CTAB (بافر لیزکننده شامل پودر CTAB به همراه بافر ۱ مولار TRic-Hcl (اسیدیتهٔ برابر ۸)، محلول ۰/۵ مولار Na_2EDTA (اسیدیتهٔ برابر ۸) و NaCl ۰/۵ مولار بود) با دمای ۶۵ درجهٔ سانتی‌گراد به آن اضافه شد. نمونه‌ها به مدت نیم ساعت در حمام آب گرم در دمای ۶۰ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شدند و طی این مدت، ویال‌ها هر ۵ دقیقه یک بار تکان داده شدند. هم‌حجم نمونه‌ها، کلروفرم ایزوآمیل‌الکل (۱:۲۴) افزوده شد و نمونه‌ها به‌شدت مخلوط شدند. نمونه‌ها ۱۰ دقیقه روی شیکر قرار داده شدند و هر چند دقیقه یک بار ویال‌ها به‌مدت ۵ ثانیه به‌شدت تکان داده شدند؛ سپس نمونه‌ها به‌مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دوردردقیقه سانتریفیوژ شدند. در این مرحله، سه فاز تشکیل شد و مایع بالایی به ویال جدید منتقل و هم‌حجم آن ایزوپروپانول سرد خالص اضافه شد. محتویات هر ویال به‌آرامی و با وارونه‌کردن ویال‌ها کاملاً مخلوط شد و ویال‌ها ۱۰ دقیقه روی یخ قرار داده شدند. برای ته‌نشین‌شدن DNA، نمونه‌ها ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دوردردقیقه در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد سانتریفیوژ

شدند. مایع بالایی به‌آرامی خارج شد و ۵۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد به رسوب DNA اضافه شد. نمونه‌ها ۵ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دوردردقیقه سانتریفیوژ شدند و فاز رویی به‌آرامی از ویال خارج شد. سپس ویال‌ها به‌مدت ۱ ساعت در معرض هوا قرار داده شدند تا DNA خشک شود. پس‌ازآن، ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل دیونیزه به هر ویال اضافه شد و نمونه‌ها یک شب در یخچال با دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شدند. نمونه‌ها برای نگهداری طولانی‌مدت به فریزر منفی ۲۰ درجهٔ سانتی‌گراد منتقل شدند. کیفیت DNA استخراج‌شده با الکتروفورز روی ژل آگارز ۱ درصد و بررسی جذب نوری تأیید شد (۲۳).

PCR: هر مخلوط واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر حاوی ۷ میکرولیتر نمونهٔ DNA بود. برای شناسایی جدایه‌هایی که بر اساس ویژگی‌های فنوتیپی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* شناسایی شده بودند از آغازگر اختصاصی plantF (پیش‌برنده) و آغازگر عمومی pRE (معکوس) برای جنس *لاکتوباسیلوس* استفاده شد. آغازگر اختصاصی بر اساس توالی ویژه‌ای از ژن *rec* A (طراحی‌شده توسط توریانی[17] و همکاران) استفاده شد (۱۵). آغازگرها از شرکت سیناژن خریداری شدند.

غلظت نهایی آغازگر در هر مخلوط واکنش PCR معادل ۱ میلی‌مولار بود؛ به این منظور، ۰/۵ میکرولیتر از محلول آغازگر به هر مخلوط واکنش اضافه شد و سپس مسترمیکس (آمپلیکون[18]، دانمارک) شامل مخلوط نوکلئوتیدی dNTP، $MgCl_2$، آنزیم Taqپلیمراز و بافر افزوده شد. برنامهٔ PCR (دستگاه تکن[19]، انگلیس) به‌شکل دناتوره‌شدن در ۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۳ دقیقه و پس‌ازآن، واکنش تکثیری مرحلهٔ اول در ۳۰ چرخه شامل واسرشت‌سازی در ۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر در ۵۱ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۴۵ ثانیه، مرحلهٔ طویل‌شدن در ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه و گسترش نهایی در ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه تنظیم شد. برای مشاهدهٔ محصولات PCR، ۵ میکرولیتر از محصول در چاهک‌های ژل آگارز ۱ درصد در بافر TBE دارای مشاهده‌گر سبز[20] با ولتاژ ثابت ۸۰ ولت الکتروفورز شد. جریان برق پس‌از گذشت ۹۰ دقیقه قطع شد و از ژل در دستگاه ژل‌داک[21] با اشعهٔ ماورای بنفش عکس‌برداری شد.

نتایج

۱۶ ریزموجود جداسازی‌شده روی محیط کشت MRS شامل کوکسی‌های گرم مثبت و گرم منفی و باسیل‌های میله‌ای گرم مثبت و گرم منفی بودند (جدول ۱). در بین این ریزموجودات، ۱۰ جدایه باکتری‌های باسیلی‌شکل بودند و در بین این گروه، از ۸ جدایه که پاسخ آنها به آزمون‌های کاتالاز، اکسیداز و احیای نیترات منفی بود به‌عنوان *لاکتوباسیلوس*های احتمالی در آزمایش‌های بعدی استفاده شد.

در ۲۴ ساعت اول گرماگذاری، باکتری‌ها در دماهای ۲۰ و ۴۰ درجهٔ سانتی‌گراد به‌خوبی رشد کردند. زمان رشد برای دمای ۱۵ درجهٔ سانتی‌گراد ۴۸ ساعت در نظر گرفته شد. فقط جدایه‌های V1، V9 و V16 در دمای ۴۵ درجهٔ سانتی‌گراد رشد کردند. باکتری‌ها در غلظت‌های ۴/۵ و ۶/۵ درصد نمک توانایی رشد داشتند. در غلظت ۴/۵ درصد کدورت رشد بسیار زیاد و مشابه نمونه‌های شاهد بود. جدایه‌های V1، V3، V8، V12، V13 و V16 رشدی نزدیک به شاهد در غلظت ۶/۵ درصد نمک داشتند (جدول ۲).

همهٔ جدایه‌ها در غلظت ۰/۳ درصد نمک صفراوی اکس‌گال به‌خوبی (مشابه شاهد در محیط بدون نمک) رشد کردند. جدایه‌های V3، V8، V12، V13 و V16 رشد خوبی در غلظت ۰/۵ درصد اکس‌گال نشان دادند (جدول ۲). همهٔ ۸ جدایه در اسیدیتهٔ ۳/۵ به‌خوبی رشد کردند هرچند هیچ‌یک از آنها توانایی رشد در اسیدیته‌های ۲ و ۹/۶ را نداشتند (جدول ۲).

استفادهٔ باکتری از قندها در جدول ۳ نشان داده شده است. باتوجه‌به تخمیر قندها، مطابق با طبقه‌بندی برجی[۲۲] (۱۷)، جدایه‌های V1، V3، V5، V8، V12 و V16 باکتری‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* احتمالی انتخاب و با آغازگرهای اختصاصی (از طریق واکنش PCR) بررسی شدند. تشکیل باند ۳۱۸ جفت بازی در الکتروفورز محصولات PCR هر ۶ جدایه نشان‌دهندهٔ گونهٔ *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و تأییدکنندهٔ نتایج بیوشیمیایی بود (شکل ۱).

طبق نتایج، جدایه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* به آنتی‌بیوتیک‌های ونکومایسین، سیپروفلوکساسین، اوفلوکساسین، نالیدیکسیک‌اسید، اریترومایسین، جنتامایسین و کانامایسین مقاوم هستند.

جدول ۱- ویژگی‌های ریخت‌شناسی و آنزیمی ریزموجودات جداسازی‌شده از ریزوسفر برنج لنجان

شمارهٔ جدایه	شکل سلول	گرم	کاتالاز	اکسیداز
V1	باسیل	مثبت	−	−
V2	کوکسی	مثبت	+	+
V3	باسیل	مثبت	−	−
V4	کوکسی	منفی	+	−
V5	باسیل	مثبت	−	−
V6	کوکسی	منفی	+	−
V7	باسیل	منفی	+	−
V8	باسیل	مثبت	−	−
V9	باسیل	مثبت	−	−
V10	کوکسی	مثبت	+	−
V11	باسیل	منفی	+	+
V12	باسیل	مثبت	−	−
V13	باسیل	مثبت	−	−
V14	کوکسی	منفی	+	−
V15	کوکسی	منفی	+	+
V16	باسیل	مثبت	−	−

جدول ۲- رشد جدایه‌های *لاکتوباسیلوس* جداشده از ریزوسفر برنج در غلظت‌های مختلف نمک، اکس‌گال و اسیدیته‌های متفاوت

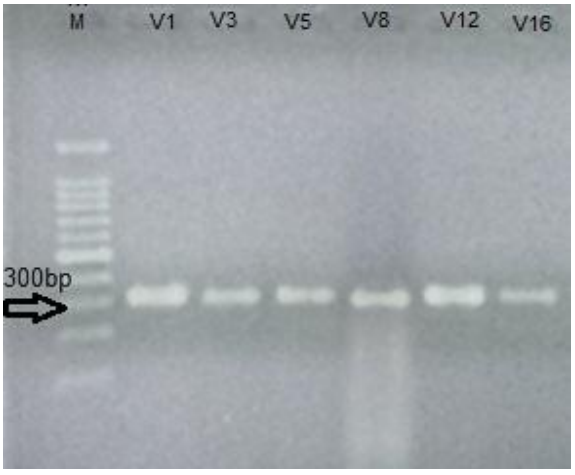
سویه	۱۵درجه	۲۰درجه	۴۰درجه	۴۵درجه	اسیدیتهٔ ۲	اسیدیتهٔ ۳/۵	اسیدیتهٔ ۹/۶	۰/۳درصد اکس‌گال	۰/۵درصد اکس‌گال	۴/۵درصد نمک	۶/۵درصد نمک
V1	+	+	+	+	−	+	−	+	W	+	+
V3	+	+	+	W	−	+	−	+	+	+	+
V5	+	+	+	W	−	+	−	+	W	+	W
V8	+	+	+	W	−	+	−	+	+	+	+
V9	+	+	+	+	−	+	−	+	W	+	W
V12	+	+	+	W	−	+	−	+	+	+	+
V13	+	+	+	W	−	+	−	+	+	+	+
V16	+	+	+	+	−	+	−	+	+	+	+

+: رشد، −: رشدنکردن، w: رشد ضعیف

جدول ۳- ویژگی رشدی جدایهٔ *لاکتوباسیلوس* جداشده از ریزوسفر برنج در محیط‌های حاوی قندهای مختلف

سویه	آرابینوز	سلوبیوز	فروکتوز	گالاکتوز	گلوکونات	لاکتوز	مانوز	مانیتول	ملیبیوز	سوربیتول	رافینوز	ترهالوز	ریبوز	زایلوز
V1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	W	+	−
V3	W	+	+	+	W	+	+	+	+	+	+	+	+	−
V5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−
V8	+	+	+	+	+	+	+	+	W	+	+	+	+	−
V9	−	+	+	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	−
V12	+	+	+	+	W	+	W	+	+	+	+	+	+	−
V13	−	+	−	+	W	+	+	W	+	+	W	W	+	+
V16	W	W	+	+	W	+	+	+	W	+	+	+	+	−

+: رشد، −: رشدنکردن، w: رشد ضعیف



شکل ۱- تشکیل باند ۳۱۸ جفت بازی در الکتروفورز محصولات PCR *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*. V1، V3، V5، V8، V12 و V16:. جدایه‌های باکتری، M: نشانگر.

بحث و نتیجه‌گیری.

در سال‌های اخیر علاوه‌بر زمینهٔ پزشکی و سلامتی، تمایل به کاربردهای غذایی و کشاورزی پروبیوتیک‌ها افزایش یافته است؛ به‌طوری‌که استفاده از این باکتری‌ها در بخش کشاورزی برای کاهش‌دادن استفاده از مواد شیمیایی و به‌حداقل‌رساندن آلودگی مؤثر بوده و مصرف منابع انرژی تجدیدپذیر را افزایش داده است؛ به‌همین‌علت یافتن سویه‌های پروبیوتیک جدید با کاربردهای متنوع اهمیت بسیاری یافته است. اگرچه محصولات لبنی نخستین منابع مواد غذایی پروبیوتیک شناخته‌شده هستند (۹ و ۱۱)، مطالعه‌ها طی دهه‌های اخیر نشان داده‌اند منابع غیرلبنی و غیرروده‌ای مانند آبمیوه‌ها، غذاهای سنتی تخمیری، خاک ریزوسفر درختان میوه، گیاهان خوراکی و خاک مزارع نگهداری حیوانات منابع خوبی برای جداسازی این باکتری‌ها هستند (۶ و ۲۴). استفاده از این باکتری‌ها به‌عنوان پروبیوتیک در صنایع مختلف مستلزم تحمل این باکتری‌ها نسبت به شرایط نامطلوب محیطی است؛ برای نمونه، این باکتری‌ها می‌بایست شرایط اسیدی تا قلیایی دستگاه گوارش و وجود صفرا در بدن انسان و حیوان را تحمل و رشد کنند. در صنایع غذایی نیز این باکتری‌ها باید بتوانند در مواد غذایی متنوع با اسیدیته‌ها و دماهای مختلف و گاه حضور نمک زنده بمانند. در خاک نیز باکتری‌ها باید شرایط خاک (وجود املاح و ترکیبات مختلف) و شرایط محیطی (گرما یا سرما) را تحمل کنند و به رشد و بقای خود ادامه دهد (۲۵)..

در مطالعهٔ حاضر، نتایج بیوشیمیایی و مولکولی (با استفاده از آغازگرهای اختصاصی) حضور باکتری‌های پروبیوتیک به‌ویژه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* که از مفیدترین باکتری‌های این گروه است را در شرایط محیطی خاک ریزوسفر برنج لنجان اثبات کرد. در ایران، این باکتری فقط از لبنیات استخراج شده است و گزارش‌هایی مبنی بر استخراج این گونه از زیتون تخمیری و شیر مادر نیز وجود دارد (۲۶ و ۲۷). تاکنون گزارشی مبنی بر جداسازی این گونه از ریزوسفر ریشهٔ برنج مشاهده نشده است. در مطالعهٔ حاضر، باکتری‌های بررسی‌شده توانایی مناسبی برای تحمل اسیدیته، دماهای مختلف و شرایط اسیدی از خود نشان دادند و توانایی رشد این باکتری‌ها در دامنهٔ دمایی ۱۵ تا ۴۵ درجهٔ سانتی‌گراد نشان داد این باکتری‌ها توانایی زنده‌ماندن و حتی تکثیرشدن در خاک، فصل‌های مختلف و بدن حتی هنگام تب را دارند. در مطالعه‌های پیشین، *لاکتوباسیلوس*های استخراج‌شده تحمل کمی به شرایط اسیدی (اسیدیتهٔ کمتر از ۴) از خود نشان داده‌اند اما در مطالعهٔ حاضر، باکتری‌های استخراج‌شده در اسیدیته‌های کمتر (اسیدیتهٔ ۳) نیز به‌خوبی رشد کردند (۲۸). در پژوهش‌های د-وریس[۲۳] و همکاران نشان داده شده است *لاکتوباسیلوس*ها اکثراً در غلظت نمک بیش از ۵ درصد رشد ضعیفی دارند و درصد بقا در غلظت‌های زیاد نمک به‌طور درخور توجهی کاهش می‌یابد (۵). همهٔ جدایه‌هایی که در پژوهش حاضر *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* شناسایی شدند رشد درخور توجهی (برابر با شاهد) در غلظت ۶/۵ درصد نمک داشتند و فقط جدایهٔ در این محیط رشد ضعیفی از خود نشان داد (۵)؛ همچنین این باکتری‌ها مقاومت خوبی در محیط‌های اسیدی و حاوی صفرا از خود نشان دادند که نشان‌دهندهٔ توانایی بقای آنها در محیط اسیدی معده و روده هنگام گرسنگی است. به‌طورکلی، مقایسه و تطابق نتایج مطالعه‌های مختلف در زمینهٔ مقاومت به اسید و صفرا به‌سختی امکان‌پذیر است. علت‌های مختلفی مانند تفاوت در نوع سویه‌های آزمایش‌شده، میزان حساسیت به شرایط اسیدی و نمک صفراوی در باکتری‌های آزمایش‌شده و تفاوت در شرایط آزمایش (ازنظر محیط‌کشت و مواد استفاده‌شده) باعث شده است ارزیابی چنین معیارهایی حتی در سویه‌های تجارتی نیز متفاوت باشد (۱۸). در مطالعه‌های انجام‌شده، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در میان گونه‌های مختلف *لاکتوباسیلوس* عادت‌پذیرترین گونه شناخته شده است؛ ژنوم بزرگ و توانایی آنزیمی قوی باعث شده است *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در منابع زیستی متفاوت حضور داشته باشد (۵).

مقاومت این باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک، باکتری‌های فوق را گزینهٔ مناسبی برای مطالعه و استفاده در بخش سلامت و پزشکی مطرح می‌کند. باکتری‌های پروبیوتیکی که توانایی مقاومت به داروهای استفاده‌شده در درمان‌ها به‌ویژه عفونت‌های گوارشی را داشته باشند گزینه‌های مناسبی برای استفاده در حفظ فلور میکروبی افراد دریافت‌کنندهٔ آنتی‌بیوتیک هستند؛ هرچند بررسی‌ها نشان داده‌اند به‌علت احتمال انتقال مقاومت به باکتری‌های بیماری‌زا، تمام باکتری‌های پروبیوتیک گزینهٔ مناسبی برای این منظور نیستند. در لیست پیش‌بینی معتبر ایمنی QPS (Qualified Presumption of Safety) که ادارهٔ ایمنی غذایی اروپا EFSA (European Food Safety Authority) منتشر کرده است *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* یکی از ریزموجودات بی‌خطر و مفید گزارش شده است (۲۹).

پژوهش حاضر نشان می‌دهد ریزوسفر برنج منبعی طبیعی برای جداسازی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* است. این باکتری توانایی زیادی برای تحمل شرایط نامساعد دارد و به نظر می‌رسد گزینهٔ مناسبی برای مطالعه به‌عنوان پروبیوتیک مناسب باشد.

References

(1) Shah NP. Functional cultures and health benefits. *International Journal of Dairy Science* 2007; 17: 1262-1277.

(2) Ahmadzadeh M. *Biological control of plant diseases*. Tehran: Tehran University Press; 2013.

(3) Haas D., Defago G. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology* 2005; 3: 307-319.

(4) Picard C., Bosco M. Genotypic and phenotypic diversity in populations of plant-probiotic *Pseudomonas* spp. colonizing roots. *Naturwissenschaften* 2008; 95:1-16.

(5) De Vries MC., Vaughan EE., Kleerebezema M., de Vosa WM. *Lactobacillus plantarum* survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. *International Dairy Journal* 2006; 16(9): 1018-1028.

(6) Sornplang P., Piyadeatsoontorn S. Probiotic isolates from unconventional sources: a review. *Journal of Animal Science and Technology* 2016; 58: 1-11.

(7) Kamruzzaman M., Khatun S., Islam SMN., Haque MA. Characterization of some rhizospheric bacteria and their plant growth promoting potentialities in nutrient stress environment. *International Journal of Innovative Science, Engineering & Technology* 2015; 2(9): 805-819.

(8) Islam MT., Hossain MM. Plant probiotics in phosphorus nutrition in crops, with special reference to rice In: Maheshwari D. K., editor. *Bacteria in Agrobiology: Plant Probiotics*. Berlin-Heidelberg: Springer; 2012: 325-363.

(9) Ruiza D., Agaras B., de Werrab P., Wall LG., Valverd C. Characterization and screening of plant probiotic traits of bacteria isolated from rice seeds cultivated in Argentina. *The Journal of Microbiology* 2011; 49(6): 902-912.

(10) Fhoula I., Najjari A., Turki Y., Jaballah S., Boudabous A., Ouzari H. Diversity and Antimicrobial Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated from Rhizosphere of Olive Trees and Desert Truffles of Tunisia. *BioMed Research International* 2013; 1-14.

(11) Rigobelo EC. *Probiotics*. Brazil: UNESP Univercity Estadual Paulista; 2012.

(12) Breidenbach B., Pump J., Dumont MG. Microbial community structure in the rhizosphere of rice plants. *Frontiersin Microbiology* 2016; (6): 1-12.

(13) Hemati Farsani M., Ghezelbash M., Darbani SMR., Eslami Majd A., Soltanolkotabi M. Determination of trace elements in some types of iranian rice using laser induced breakdown spectroscopy. *Journal of Mazandaran University Medical Sciences* 2014; 24(118): 24-32.

(14) Rahimi GH., Kolahchi Z., Charkhabi A. Uptake and translocation of some heavy metals by rice crop (*Oryza sativa*) in paddy soils. *Agriculture (Pol'nohospodárstvo)* 2018; 63(4): 163-175.

(15) Torriani S., Felis GE., Dellaglio F. Differentiation of *Lactobacillus plantarum, L. pentosus* and *L. paraplantarum* by *rec* A gene sequence analysis and multiplex PCR assay with *rec* A gene derived primers. *Applied and Environmental Microbiology* 2001; 67: 3454-3459.

(16) Dworkin MM., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer KH., Stackebrandt E. *The Prokaryotes*. 3rd ed. New York: Springer; 2006.

(17) Kandler O., Weiss N. Genus *Lactobacillus* In: Sneath P.H.A., Halt J., Nair NS., Sharpe ME. editors. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 8th ed. Baltimore: Williams and Wilkins; 1986: 1216- 1225.

(18) Succi M., Tremonte P., Reale A., Sorrentino E., Grazia L., Pacifico S. Bile salts and acid tolerance of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. *FEMS Microbiology Letters* 2005; 244: 129-137.

(19) Yavuzdurmaz H. Isolation characterization and determination of probiotic properties of Lactic Acid Bacteria from human milk (Masters Thesis). Izmir Institute of Technology: School of engineering and science; 2007.

(20) Gueimonde M., Sánchez B., de los Reyes-Gavilán CG., Margolles A. Antibiotic resistance in probiotic bacteria. *Frontiers in Microbiology* 2013; 4: 202.

(21) Cebeci A., Gurakan C. Properties of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. *Food Microbiology* 2003; 20: 511-518.

(22) Melvin P., Weinstein, MD. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 28th ed. *Clinical and laboratory standards institute*. USA: Wayne; 2017.

(23) Murray MG., Thompson WF. Rapid isolation of high molecular wright plant DNA. *Nucleic Research* 1980; 8: 4321-4325.

(24) Rivera-Espinoza Y., Gallardo-Navarro Y. Non-dairy probiotic products. *Food Microbiology* 2010; 27: 1-11.

(25) Song D., Hayek S., Ibrahim S. Recent application of probiotics in food and agricultural science In: Rigobelo EC. editor. *Immunology and microbiology* "*Probiotics*". London, United Kingdom: INTECH Publisher; 2012: 123-141.

(26) Esmaeili T., Emami ZD., Ahadi AM., Shahanipour K., Shafighi M. Identification of *lactobacillus plantarum* isolated from olive by PCR-RFLP method. *Journal of Microbiological Biotechnology, Islamic Azad University* 2012; 4(12): 21-28.

(27) Lashni E., Soltan Dalal MM., Davoud Abadi A. The beneficial effects of probiotic bacteria isolated from breast milk. The second national conference on the health of milk from production to consumption and its nutritional importance, Food and Drug Administration, University of Medical Sciences, Tehran, Iran; 2014.

(28) Tanasupawat S., Suzuki KI., EzakiT., Kozaki M. Characterization and identification of *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus plantarum* strains from fermented foods in Thailand. *Journal of General and Applied Microbiology* 1992; 38(2): 121-134.

(29) BIOHAZ. Update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 7: suitability of taxonomic units notified to EFSA until September 2017. *EFSA Journal* 2018; 16(1): 5131.

---

[1]- probiotic
[2]- Lilly
[3]- Stillwell
[4]- Plant Growth Promoting Bacteria
[5]- Plant probiotic Bacteria
[6]- Haas
[7]- picard
[8]- Yeild Incresing Bacteria
[9]- Bioremediation, Rhizoremediation, Phytoremediation
[10]- Phytostimulation
[11]- Recombinase A
[12]- de Man, Rogosa and Sharpe
[13]- oxgall
[14]- Cebeci
[15]- Murray
[16]- Thompson
[17]- Torriani
[18]- Amplicon
[19]- Techne
[20]- Green viwer
[21]- Gel document
[22]- Bergey
[23]- De Vries