

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

Sabere Nouri

Msc Student, Dept. of Biotechnology, Fac. of Agriculture, Bu-Ali Sina Un., sabere.nuri@yahoo.com

Sonbol Nazeri *

Assistant Professor, Dept. of Biotechnology, Fac. of Agriculture, Bu-Ali Sina Un., snbnazeri@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 *Lactobacillus* 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, 40°C, 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

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

صابره نوری: کارشناس ارشد گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران، sabere.nuri@yahoo.com
سنبل ناظری*: استادیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران، snblnazeri@yahoo.com
پرهام حسینی: مربی گروه بیوشیمی، دانشگاه اوتتاگو، 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 ضد میکروبی از جمله 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 مطالعه ویژگی‌های مولکولی، بیوشیمیایی و پروبیوتیکی این ریزموجود است.

مواد و روش‌ها: نمونه برداری از ریزوسفر برنج رقم لنجان (منطقه 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 باسیلی شکل گرم مثبت انجام شدند. توانایی رشد جدایه‌ها در حضور نمک صفراوی و اسیدینه‌ها 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 جدا شده از ریزوسفر گیاه مطالعه شده، ۱۰ باکتری باسیلی شکل 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 اسیدینه برابر ۳/۵، دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و حضور ۰/۳ درصد صفرا به خوبی (مشابه نمونه‌های شاهد) رشد کردند. باکتری‌ها به ۷ آنتی‌بیوتیک از ۱۲ آنتی‌بیوتیک بررسی شده 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

* نویسنده مسئول مکاتبات

مقدمه

واژه پروبیوتیک^۱ از واژه یونانی پروبیوس به معنای حیات‌بخش یا زیست‌بخش گرفته شده است. نخستین بار، لیلی^۲ و استیلول^۳ در سال ۱۹۶۵ این واژه را با مفهوم متفاوتی از مفهوم امروزی تعریف کردند و پروبیوتیک‌ها را عوامل تحریک‌کننده 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^۴ (باکتری‌های القاکننده رشد) یا PPB^۵ (باکتری‌های پروبیوتیک گیاهی) شناخته می‌شوند (۲). هاس^۶ و همکاران و پس از آن، پیکارد^۷ و همکاران اصطلاح پروبیوتیک را برای این دسته از باکتری‌های گیاهی به کار بردند (۳ و ۴). این باکتری‌ها YIB^۸ (باکتری‌های افزایش‌دهنده عملکرد) نیز نامیده می‌شوند (۲). لاکتوباسیلوس‌ها با گونه‌های متعدد یکی از مهم‌ترین جنس‌های باکتری‌های پروبیوتیک هستند و لاکتوباسیلوس پلاتناروم‌ها یکی از مهم‌ترین این باکتری‌ها به شمار می‌روند. علاوه بر جنبه‌های مختلف لاکتوباسیلوس پلاتناروم در سلامتی انسان و حیوان و نیز صنعت، این باکتری به‌علت داشتن توانایی زیاد در سازگار و منطبق شدن با نیچ‌های متفاوت درخور توجه است (۵). لاکتوباسیلوس پلاتناروم‌ها از نظر ریخت‌شناسی باکتری‌های میله‌ای شکل با انتهای گرد هستند، آرایش سلولی آنها به‌شکل منفرد، جفتی و

زنجیره‌های کوتاه است، از گروه ریزموجودات بی‌هوازی اختیاری هستند و کلنی آنها از نظر 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 تحریک‌کننده سیستم ایمنی از جمله 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 عمده جداسازی این ریزموجودات از منابع مختلف است (۶).

مطالعه‌ها نشان داده‌اند باکتری‌های ریزوسفر خاک (از جمله لاکتوباسیلوس‌ها) به‌شکل‌های مختلفی در رشد و سلامت گیاه مؤثر هستند (۷). ریزموجودات ریزوسفر با فراهم کردن مواد غذایی، فیتوهورمون‌ها، ترکیبات سرکوب‌کننده 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 همه 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 تغذیه گیاه کمک می‌کنند و رشد گیاه را

ریزوموجودات دارای هر دو نوع متابولیسم هوازی و غیرهوازی را انتخاب می‌کند (۱۲). وارسته برنج لنجان یکی از انواع برنج‌های ایران است که در منطقه لنجان (در فاصله ۵۰ کیلومتری جنوب غربی اصفهان) کشت می‌شود. این خطه به علت آب و هوای مناسب و خاک غنی از درشت مغذی‌ها و ریزمغذی‌ها از نظر کشاورزی مهم‌ترین تولیدکننده برنج در استان اصفهان به شمار می‌آید و وارسته برنج لنجان از برنج‌های محبوب ایرانیان محسوب می‌شود. در چند مطالعه انجام شده، حضور فلزهای سنگینی مانند کروم، سرب و کادمیوم در محیط کشت برنج لنجان گزارش شده است (۱۳ و ۱۴).

شناسایی لاکتوباسیلوس‌ها 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 کدکننده پروتئین‌های اختصاصی مانند *RecA* تفاوت‌های لازم برای جدا کردن 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)، جفت شدن و تبادل هومولوگ DNA و هیدرولیز ATP اثبات شده است. پژوهشگران آغازگر اختصاصی ژن *recA* را در بررسی گونه‌های مختلف لاکتوباسیلوس به ویژه لاکتوباسیلوس پلانتاروم استفاده و تأیید کرده‌اند (۱۵).

باتوجه به اهمیت ریزوموجودات خاک و ریزوسفر ریشه به ویژه لاکتوباسیلوس‌ها در رشد و نمو گیاهان و نیز

به‌طور غیرمستقیم افزایش می‌دهند؛ علاوه بر این، پروبیوتیک فعالیت ریزوموجودات بیماری‌زا را از طریق آنتاگونیسم‌های میکروبی کاهش می‌دهد و با فعال‌سازی گیاه برای حفاظت بهتر از خود باعث پدیده «مقاومت سیستمیک القاشده» می‌شود (۸-۱۱). نشان داده شده است لاکتوباسیلوس‌ها در مهار قارچ‌های میکروسکوپی از جمله *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* و *Fusarium graminearum* و باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی از جمله *Xanthomonas campestris* و *Erwinia carotovora* کارآمد هستند (۲ و ۱۰). این باکتری‌ها در تجزیه زیستی آلاینده‌های محیطی^۹ و تولید مواد کلاته‌کننده فلزهای سنگین و کاهش سمیت فلزهای سنگین^{۱۰} نقش دارند (۲).

باکتری‌های لاکتیک‌اسید در صنعت به‌علت فیزیولوژی ویژه و ویژگی‌های بیوشیمیایی مانند تولید آگروپلی‌ساکاریدها، اسیدهای آلی، ترکیبات معطر، تحمل فعالیت آبی کم و تولید مواد ضد میکروبی درخور توجه هستند و کاربردهای مختلفی یافته‌اند؛ از جمله، در بررسی‌ها نشان داده شده است برخی سویه‌های باکتری‌های لاکتوباسیل قادر به مهار بیماری‌زاهای خوراکی مانند *Listeria monocytogenes* و *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* و *Staphylococcus aureus* هستند. باتوجه به 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

باکتری برای شاهد منفی و باکتری استافیلوکوکوس اورئوس برای شاهد مثبت و در آزمون اکسیداز، استافیلوکوکوس اورئوس برای شاهد مثبت و استریپتوکوک پنومونیا برای شاهد منفی استفاده شد (۱۶).

تولید اسید از قندها با به کارگیری محیط MRS بدون عصاره گوشت و گلوکز انجام شد؛ به این منظور، در هر لوله آزمایش (دارای لوله دورهام) ۲ میلی لیتر محیط MRS مایع مخصوص تخمیر (حاوی ۱ درصد قند مدنظر) و معرف فنل رد ریخته شد. پس از تلقیح ۱ درصد از کشت فعال جدایه باکتری موردشناسایی، لوله‌ها به مدت ۷۲ ساعت تا یک هفته در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در شرایط ۵ درصد گاز دی‌اکسید کربن 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: از آنجاکه توانایی رشد باکتری‌های پروبیوتیک در شرایط مختلف از جمله اسیدیته، دما و حضور نمک برای استفاده در صنعت (از جمله 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 اکس گال^{۱۳} ارزیابی شد. برای انجام این آزمایش‌ها، ابتدا کشت فعال از هر ذخیره باکتریایی تهیه و به نسبت ۱ درصد به محیط کشت مایع موردآزمایش اضافه شد. محیط کشت‌ها به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری

کمک به رویارویی با تنش‌های محیطی از جمله حضور فلزهای سنگین و همچنین اهمیت آنها در صنایع غذایی و بخش پزشکی، پژوهش حاضر با هدف اولیه بررسی حضور لاکتوباسیلوس پلانتروم در ریزوسفر برنج لنجان انجام شد.

مواد و روش‌ها.

جمع‌آوری و آماده‌سازی نمونه‌ها: چهار نمونه از ریزوسفر برنج لنجان مزارع برنج واقع در خطه نکوآباد اصفهان (در موقعیت ۳۲ درجه و ۲۲ دقیقه عرض شمالی و ۵۱ درجه و ۳۱ دقیقه شرقی) جمع‌آوری و به آزمایشگاه فناوری دانشگاه بوعلی‌سینای همدان منتقل شدند. سری‌های رقت (رقت‌های صفر تا ۱۰^{-۴}) از نمونه‌ها در سرم فیزیولوژی استریل تهیه شدند.

کشت و گرماگذاری نمونه‌ها: ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های مختلف نمونه‌ها با پیت پاستور روی محیط کشت MRS^{۱۲} (مناسب برای رشد باکتری‌های پروبیوتیک به ویژه لاکتوباسیلوس‌ها) کشت داده شد و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد (۱۶).

بررسی ویژگی‌های ریخت‌شناسی و بیوشیمیایی:

ویژگی‌های ظاهری هر کلنی و سلول با میکروسکوپ نوری و پس از رنگ آمیزی گرم بررسی و ثبت شدند. از کلنی‌های مشابه لاکتوباسیلوس با ویژگی باکتریایی میله‌ای شکل، گرم مثبت و بدون اسپور برای انجام آزمون بیوشیمیایی و تأیید مولکولی گونه لاکتوباسیلوس پلانتروم نمونه برداری 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

سفتریاکسون (۳۰ میکروگرم)، اریترومایسین (۱۵ میکروگرم)، نالیدیکسیک اسید (۳۰ میکروگرم)، توبرامایسین (۱۰ میکروگرم)، ریفامپیسین (۵ میکروگرم)، اوفلوکساسین (۵ میکروگرم)، تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم) بودند. هاله بازدارندگی کمتر از ۹ میلی متر 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 میلی لیتر سوپانسیون باکتریایی از کشت ۲۴ ساعته با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب به درون ویال‌های جدید منتقل و ۱ میلی لیتر بافر لیزکننده CTAB (بافر لیزکننده شامل پودر CTAB به همراه بافر ۱ مولار TRic-Hcl (اسیدیته برابر ۸)، محلول ۰/۵ مولار Na₂EDTA (اسیدیته برابر ۸) و NaCl ۰/۵ مولار بود) با دمای ۶۵ درجه سانتی گراد به آن اضافه شد. نمونه‌ها به مدت نیم ساعت در حمام آب گرم در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد قرار داده شدند و طی این مدت، ویال‌ها هر ۵ دقیقه یک بار تکان داده شدند. هم‌حجم نمونه‌ها، کلروفرم ایزوآمیل الکل (۱:۲۴) افزوده شد و نمونه‌ها به شدت مخلوط شدند. نمونه‌ها ۱۰ دقیقه روی شیکر قرار داده شدند و هر چند دقیقه یک بار ویال‌ها به مدت ۵ ثانیه به شدت تکان داده شدند؛ سپس نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه 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 به آرامی و با وارونه کردن ویال‌ها کاملاً مخلوط شد و ویال‌ها ۱۰ دقیقه روی یخ قرار داده شدند. برای ته‌نشین شدن DNA، نمونه‌ها ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ

شدند. توانایی رشد جدایه‌های مطالعه شده در محیط‌های یاد شده با مشاهده تغییر کدورت پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بررسی و نتایج به شکل مثبت یا منفی تعیین شد (۱۸). توانایی رشد جدایه‌های لاکتوباسیلوس‌ها در دماهای ۱۵، ۲۰، ۴۰ و ۴۵ درجه سانتی گراد و در غلظت‌های نمک (NaCl) ۴/۵ و ۶/۵ درصد نیز بررسی شد. همچنین توانایی این ریز موجودات برای احیای نیتрат پیگیری شد (۱۹). در آزمایش‌ها، میزان رشد طی مدت ۲۴ ساعت یا بیشتر با بررسی کدورت رشد باکتری (OD₆₀₀) بررسی شد. نمونه‌ها هر یک ساعت یک بار طی شش ساعت اول و سپس در انتهای ۲۴ ساعت بررسی شدند. پس از 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 پس از درمان با آنتی‌بیوتیک یکی از فواید استفاده از باکتری‌های پروبیوتیک مقاوم به آنتی‌بیوتیک است (۲۰)؛ از این رو، مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های لاکتوباسیلوس پلاتناروم در برابر آنتی‌بیوتیک‌های مختلف بررسی شد. آزمایش بر اساس روش سبسی^{۱۴} و همکاران (۲۰۰۳) انجام شد. ۲۰۰ میکرولیتر از کشت غنی شده به ۴ میلی لیتر محیط کشت MRS آگار (۱ درصد آگار) اضافه شد. دیسک‌های آنتی‌بیوتیک در سطح محیط قرار گرفتند و قطر هاله بازدارندگی رشد اطراف دیسک‌ها در پلیت‌ها پس از ۲۴ ساعت گرماگذاری در ۳۷ درجه سانتی گراد اندازه گیری شد. دیسک‌های آنتی‌بیوتیک شامل تتراسیکلین (۳۰ میکروگرم)، ونکومایسین (۳۰ میکروگرم)، سیروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، پنی‌سیلین (۱۰ میکروگرم)، آموکسیکلاو (۳۰ میکروگرم)،

به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر در ۵۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، مرحله طویل شدن در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و گسترش نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه تنظیم شد. برای مشاهده محصولات PCR، ۵ میکرولیتر از محصول در چاهک‌های ژل آگارز ۱ درصد در بافر TBE دارای مشاهده گر سبز^{۲۰} با ولتاژ ثابت ۸۰ ولت الکتروفورز شد. جریان برق پس از گذشت ۹۰ دقیقه قطع شد و از ژل در دستگاه ژل‌داک^{۲۱} با اشعه ماورای بنفش عکس‌برداری شد.

نتایج

۱۶ ریزموجود جداسازی شده 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 باسیلی شکل بودند و در بین این گروه، از ۸ جدایه که پاسخ آنها به آزمون‌های کاتالاز، اکسیداز و احیای نیترات منفی بود به عنوان لاکتوباسیلوس‌های احتمالی در آزمایش‌های بعدی استفاده شد.

در ۲۴ ساعت اول گرماگذاری، باکتری‌ها در دماهای ۲۰ و ۴۰ درجه سانتی‌گراد به خوبی رشد کردند. زمان رشد برای دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد ۴۸ ساعت در نظر گرفته شد. فقط جدایه‌های V1، V9 و V16 در دمای ۴۵ درجه 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).

شدند. مایع بالایی به آرامی خارج شد و ۵۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد به رسوب DNA اضافه شد. نمونه‌ها ۵ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند و فاز رویی به آرامی از ویال خارج شد. سپس ویال‌ها به مدت ۱ ساعت در معرض هوا قرار داده شدند تا DNA خشک شود. پس از آن، ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل دیونیزه به هر ویال اضافه شد و نمونه‌ها یک شب در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. نمونه‌ها برای نگهداری طولانی مدت به فریزر منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. کیفیت DNA استخراج شده 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 نمونه DNA بود. برای شناسایی جدایه‌هایی که بر اساس ویژگی‌های فنوتیپی لاکتوباسیلوس پلانٹاروم 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* (طراحی شده توسط توریانی^{۱۷} 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^{۱۸}، دانمارک) شامل مخلوط نوکلئوتیدی dNTP، MgCl₂، آنزیم Taq پلیمرز و بافر افزوده شد. برنامه PCR (دستگاه تکن^{۱۹}، انگلیس) به شکل دنا توره شدن در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه و پس از آن، واکنش تکثیری مرحله اول در ۳۰ چرخه شامل واسرشت‌سازی در ۹۴ درجه سانتی‌گراد

اوفلوکساسین، نالیدیکسیک اسید، اریترومایسین، جنتامایسین و کانامایسین مقاوم هستند.

جدول ۱- ویژگی‌های ریخت‌شناسی و آنزیمی ریزوموجودات

جداسازی شده از ریزوسفر برنج لنجان

شماره 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	-	-

همه جدایه‌ها در غلظت ۰/۳ درصد نمک صفرای اکس گال به خوبی (مشابه شاهد در محیط بدون نمک) رشد کردند. جدایه‌های V3، V8، V12، V13 و V16 رشد خوبی در غلظت ۰/۵ درصد اکس گال نشان دادند (جدول ۲). همه ۸ جدایه در اسیدیته ۳/۵ به خوبی رشد کردند هرچند هیچ یک از آنها توانایی رشد در اسیدیته‌های ۲ و ۹/۶ را نداشتند (جدول ۲).

استفاده باکتری از قندها در جدول ۳ نشان داده شده است. با توجه به 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 نشان‌دهنده گونه لاکتوباسیلوس پلانتاروم و تأیید کننده نتایج بیوشیمیایی بود (شکل ۱).

طبق نتایج، جدایه‌های لاکتوباسیلوس پلانتاروم به آنتی‌بیوتیک‌های ونکومایسین، سیپروفلوکساسین،

جدول ۲- رشد جدایه‌های لاکتوباسیلوس جدا شده از ریزوسفر برنج در غلظت‌های مختلف نمک، اکس گال و اسیدیته‌های متفاوت

سویه	۱۵درجه	۲۰درجه	۴۰درجه	۴۵درجه	اسیدیته ۲	اسیدیته ۳/۵	اسیدیته ۹/۶	اکس گال ۰/۳درصد	اکس گال ۰/۵درصد	۴/۵درصد نمک	۶/۵درصد نمک
V1	+	+	+	+	-	+	-	+	W	+	+
V3	+	+	+	W	-	+	-	+	+	+	+
V5	+	+	+	W	-	+	-	+	W	+	W
V8	+	+	+	W	-	+	-	+	+	+	+
V9	+	+	+	+	-	+	-	+	W	+	W
V12	+	+	+	W	-	+	-	+	+	+	+
V13	+	+	+	W	-	+	-	+	+	+	+
V16	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+

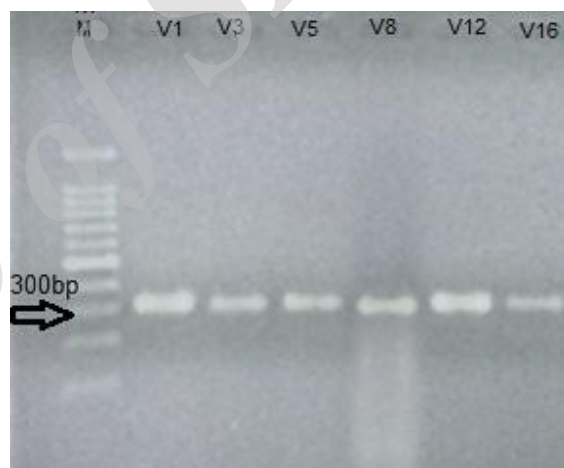
+ : رشد، - : رشد نکردن، W : رشد ضعیف

جدول ۳- ویژگی رشدی جدایه‌های لاکتوباسیلوس جداسازی شده از ریزوسفر برنج در محیط‌های حاوی قندهای مختلف

سویه	آرابینوز	سلوبیوز	فروکتوز	گالاکتوز	گلوکونات	لاکتوز	مانوز	فانتول	ملبیوز	سوربیتول	رافینوز	ترهالوز	ریبوز	زایلوز
V1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	W	+	-
V3	W	+	+	+	W	+	+	+	+	+	+	+	+	-
V5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
V8	+	+	+	+	+	+	+	+	W	+	+	+	+	-
V9	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
V12	+	+	+	+	+	+	W	+	+	+	+	+	+	-
V13	-	+	-	+	+	+	+	W	+	+	W	W	+	+
V16	W	W	+	+	+	+	+	+	W	+	+	+	+	-

+: رشد، -: رشد نکردن، W: رشد ضعیف

به‌همین علت یافتن سویه‌های پروبیوتیک جدید با کاربردهای متنوع اهمیت بسیاری یافته است. اگرچه محصولات لبنی نخستین منابع مواد غذایی پروبیوتیک شناخته شده 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)..



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

بحث و نتیجه‌گیری

در سال‌های اخیر علاوه بر زمینه پزشکی و سلامتی، تمایل به کاربردهای غذایی و کشاورزی پروبیوتیک‌ها افزایش یافته است؛ به‌طوری‌که استفاده از این باکتری‌ها در بخش کشاورزی برای کاهش دادن استفاده از مواد شیمیایی و به‌حداقل رساندن آلودگی مؤثر بوده و مصرف منابع انرژی تجدیدپذیر را افزایش داده است؛

توانایی بقای آنها در محیط اسیدی معده و روده هنگام گرسنگی است. به طور کلی، مقایسه و تطابق نتایج مطالعه‌های مختلف در زمینه مقاومت به اسید و صفرا به سختی امکان پذیر است. علت‌های مختلفی مانند تفاوت در نوع سویه‌های آزمایش شده، میزان حساسیت به شرایط اسیدی و نمک صفراوی در باکتری‌های آزمایش شده و تفاوت در شرایط آزمایش (از نظر محیط کشت و مواد استفاده شده) باعث شده است ارزیابی چنین معیارهایی حتی در سویه‌های تجارتي نیز متفاوت باشد (۱۸). در مطالعه‌های انجام شده، لاکتوباسیلوس پلانتروم در میان گونه‌های مختلف لاکتوباسیلوس عادت پذیرترین گونه شناخته شده است؛ ژنوم بزرگ و توانایی آنزیمی قوی باعث شده است لاکتوباسیلوس پلانتروم در منابع زیستی متفاوت حضور داشته باشد (۵).

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

در مطالعه حاضر، نتایج بیوشیمیایی و مولکولی (با استفاده از آغازگرهای اختصاصی) حضور باکتری‌های پروبیوتیک به ویژه لاکتوباسیلوس پلانتروم 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 ریشه برنج مشاهده نشده است. در مطالعه حاضر، باکتری‌های بررسی شده توانایی مناسبی برای تحمل اسیدیته، دماهای مختلف و شرایط اسیدی از خود نشان دادند و توانایی رشد این باکتری‌ها در دامنه دمایی ۱۵ تا ۴۵ درجه سانتی‌گراد نشان داد این باکتری‌ها توانایی زنده ماندن و حتی تکثیر شدن در خاک، فصل‌های مختلف و بدن حتی هنگام تب را دارند. در مطالعه‌های پیشین، لاکتوباسیلوس‌های استخراج شده تحمل کمی به شرایط اسیدی (اسیدیته کمتر از ۴) از خود نشان داده‌اند اما در مطالعه حاضر، باکتری‌های استخراج شده در اسیدیته‌های کمتر (اسیدیته ۳) نیز به خوبی رشد کردند (۲۸). در پژوهش‌های دوریس^{۳۳} و همکاران نشان داده شده است لاکتوباسیلوس‌ها اکثراً در غلظت نمک بیش از ۵ درصد رشد ضعیفی دارند و درصد بقا در غلظت‌های زیاد نمک به طور درخور توجهی کاهش می‌یابد (۵). همه جدایه‌هایی که در پژوهش حاضر لاکتوباسیلوس پلانتروم شناسایی شدند رشد درخور توجهی (برابر با شاهد) در غلظت ۶/۵ درصد نمک داشتند و فقط جدایه 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 نشان‌دهنده

with special reference to rice In: Maheshwari D. K., editor. *Bacteria in Agrobiolgy: 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. *Frontiers in 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.

پژوهش حاضر نشان می‌دهد ریزوسفر برنج منبعی طبیعی برای جداسازی لاکتوباسیلوس پلاتتاروم است. این باکتری توانایی زیادی برای تحمل شرایط نامساعد دارد و به نظر می‌رسد گزینه 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,

- (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 weight 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) Esmaili 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., Ezaki T., 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 Increasing 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