

Bazı Fermente Gıdalardan İzole Edilen *Lactobacillus plantarum* Suşlarının Metal Dirençlilik Özellikleri

Burcu Özel¹, Halil İbrahim Kaya², Ömer Şimşek² ✉

¹Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi, Bahçe Meslek Yüksekokulu, Gıda İşleme Bölümü, Bahçe, Osmaniye

²Pamukkale Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Denizli

Geliş Tarihi (Received): Geliş Tarihi: 01.08.2016, Kabul Tarihi (Accepted): 26.10.2016

✉ Yazışmalardan Sorumlu Yazar (Corresponding author): omers@pau.edu.tr (Ö. Şimşek)

☎ 0 258 296 30 15 📠 0 258 296 32 62

ÖZ

Fermente gıdaların doğal mikroflorasını oluşturan laktik asit bakterileri (LAB) gıda üretiminde metal stresine maruz kalabilmektedir. Bu durum, LAB'lerin metabolik aktivitelerini olumsuz etkileyerek fermentasyonun duraklamasına neden olur. Bu çalışmada ekşi hamur, sucuk, beyaz peynir ve turşudan izole edilmiş ve tanımlanmış 43 adet *Lactobacillus plantarum* suşlarının Cu, Cd, Zn, Fe, Co, Al ve Cr metallerine karşı dirençlilik seviyeleri ve suşlarda dirençlilik genlerinin varlığı araştırılmıştır. *L. plantarum* suşları Fe ve Co'a karşı diğer metallerden daha fazla dirençlilik göstermiştir. Ayrıca *L. plantarum* PFC19, PFC22, PFC33 ve PFC36 suşlarının genomunda metal dirençlilikle ilişkili Cu-transport ATPaz, PFC7 ve PFC36 suşlarında ise Cd-transport-ATPaz genleri tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, *L. plantarum* PFC7, PFC19, PFC22, PFC33 ve PFC36 suşlarının genetik temelli metal dirençlilik özelliklerinden dolayı olası metal stresine karşı fermente gıdalar için starter kültür olarak uygulama potansiyeli bulunduğunu göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Laktik asit bakterisi, *L. plantarum*, Metal dirençlilik, Fermente gıdalar

Metal Resistance Properties of *Lactobacillus plantarum* Strains Isolated from Some Fermented Foods

ABSTRACT

Lactic acid bacteria constituting the natural microflora of fermented foods may expose to metal stresses during food production. This could interfere with the fermentation by influencing the metabolic activity of LAB adversely. In this study, the resistance to Cu, Cd, Zn, Fe, Co, Al and Cr of 43 *Lactobacillus plantarum* strains isolated and identified from various sourdough, sucuk, white cheese and pickle samples as well as the existence of resistance genes were determined. *L. plantarum* strains were more resistant to Fe and Co than other metals studied. Also, Cu-transport ATPase was detected in the genome of *L. plantarum* PFC19, PFC22, PFC33 and PFC36 whereas Cd-transport ATPase was found at *L. plantarum* PFC7 and PFC36. Results showed that *L. plantarum* PFC7, PFC19, PFC22, PFC33 and PFC36 have potential as starter culture in fermented foods against possible metal stress due to their genetically based metal resistance properties.

Keywords: Lactic acid bacteria, *L. plantarum*, Metal resistance, Fermented foods

GİRİŞ

Laktik asit bakterileri (LAB), karbonhidratları parçalayarak yoğunlukla laktik asit üreten bakterilerdir. Bu bakteriler, fermente gıdaların doğal mikroflorasında bulunmakta ve üretiminde starter kültür olarak kullanılmaktadır [1]. Dolayısıyla LAB tarafından üretilen laktik asit, fermente ürünlerde ürüne has tat, koku ve yapı özelliklerinin oluşmasını ve arzu edilmeyen mikroorganizmaların gelişiminin durdurulmasını sağlar. Ancak fermentasyon sonucu üretilen laktik asit gıda proseslerinde alet ve teçhizat yüzeyinden metallerin çözünürlüğünü hızlandırır. Söz konusu metal iyonları düşük konsantrasyonlarda LAB'lerin gelişimini teşvik etse de, yüksek konsantrasyonlarda üründeki mikrobiyal floranın çeşitliliğini ve starter kültürün metabolik aktivitelerini olumsuz etkileyerek hücre gelişimini durdurabilir [2]. Mikrobiyal bir strese neden olan bu durum fermente gıdalarda hem starter kültürün fonksiyonel özelliklerini kaybetmesine, hem de yüksek miktarda metal alımı insan sağlığı için risk faktörü oluşturduğundan istenmez.

Mikroorganizmalar metal iyonlarını elektron transfer sistemlerinde veya oksidasyon reaksiyonlarında kullanır ve böylece enerji üretimi sağlayabilirler. Ancak yüksek metal konsantrasyonları hücrelerde toksik etkiye neden olur. Mikroorganizmaların metal stresi ile mücadelesi tür bazında değişkenlik gösterdiği gibi söz konusu metalin toksisitesi veya konsantrasyonu da hücre ölüm oranını etkileyen spesifik faktörlerdendir Genel olarak; hücre duvarı kompozisyonunda modifikasyonlara gidilmesi, metal adsorpsiyonu ile hücre içerisine metal akümüasyonu veya proton itici kuvvet kullanarak fazla metali hücre dışına pompalama gibi birçok direnç mekanizmasına sahiptirler. Diğer taraftan mikrobiyal metal dirençlilikte genetik zenginlikte rol almaktadır. Bununla ilişkili olarak mikroorganizmalarda çeşitli metal dirençlilikle ilişkili genlerin varlığı da rapor edilmiştir [3-5].

Fermente gıdaların doğal mikroflorasında yer alan LAB türlerinde metal iyonların hücre duvarlarına adsorpsiyonun veya hücre içerisinde akümüasyonu ile oluşan metal toksisitenin engellendiği çeşitli çalışmalar ile gösterilmiştir [6, 7]. Bhakta ve ark. [8] çamur ve silaj örneklerinden izole ettikleri *Lactobacillus reuteri* Cd70-13 ve Pb71-1 suşlarının kadmiyum (Cd) ve kurşun (Pb) metallerini sırasıyla %25 ve %59 düzeylerinde adsorbe edebildiklerini, Chang ve ark. [9] *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus* suşlarının bakır (Cu) ve arsenik (Ar) metallerine karşı dirençlilik gösterdiklerini rapor etmişlerdir [8,9]. Şaraptan izole edilmiş sekiz farklı *Lactobacillus* türünde bakır adsorpsiyonu olduğu tespit edilmiştir [10]. Zhai ve ark. [11] *L. plantarum* CCFM8610 suşunun farelerde akut Cu toksisiteye karşı koruyucu etkisi olduğunu rapor edilmiştir. Laktik asit bakterilerinin metal stresinin araştırıldığı bir başka çalışmada ise, *Weissella viridescens* MYU 205 suşunun yüksek konsantrasyonlardaki Cu ve Hg metallerini hücre duvarlarında yer alan Hg bağlayıcı proteinler yardımı ile adsorbe edebildiğini göstermiştir [12]. Aynı çalışmada *W. viridescens* türünün 1×10^7 kob/mL gibi düşük hücre

yoğunluğunda bile %80 oranında Hg adsorbe edebildiği vurgulanmıştır. Nitekim bu sonuçlar gıda sistemlerinde LAB'nin belli düzeylere kadar metal bağlayıcı rolünün bulunduğuna işaret etmiştir.

Fermente gıdalarda yaygın bulunan LAB'lerin metallerin detoksifikasyonunda kullanılabilinecek güçlü biyosorbentler olduğu bildirilse de, söz konusu bu metal varlığına karşı LAB'lerin gösterdikleri dirençlilik düzeyleri ve homeostatik kontrol mekanizmalarının daha detaylı incelenmesi gerekmektedir. Bu nedenle LAB'ler için toksik olabilecek metal iyonlarının arasında ayırım yapılması, dirençlilik düzeylerinin her suşta spesifik olarak belirlenmesi ve ilgili genlerin tespit edilmesi önemli bir araştırma konusudur. Bu çalışmada ekşi hamur, sucuk, beyaz peynir ve turşudan izole edilmiş ve tanımlanmış 43 adet *L. plantarum* suşlarının, Cu, Cd, Zn, Fe, Co, Al ve Cr metallerine karşı dirençlilik seviyeleri araştırılmış ve suşlarda dirençlilik genlerinin varlığı araştırılmıştır.

MATERYAL ve METOT

Materyal

Çalışmada kullanılan peynir, sucuk, turşu ve ekşi hamurlardan izole edilmiş ve nihai tanımlamaları yapılmış 43 adet *L. plantarum* suşları kullanılmıştır. Söz konusu bu suşlar, Pamukkale Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Kültür Koleksiyonundan (PUFECC) sağlanmıştır. *L. plantarum* suşlarının geliştirilmesinde MRS (Merck, Almanya) sıvı veya katı besiyeri ortamları kullanılmıştır. Çalışma süresince *L. plantarum* suşları %20 gliserollü stok içerisinde -20°C 'de muhafaza edilmiştir.

Çalışmanın amacı doğrultusunda $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{CdN}_2\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoN}_2\text{O}_6 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ve $\text{CrN}_3\text{O}_9 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Almanya) metal bileşikleri kullanılmıştır.

Metot

L. plantarum Suşlarının Metal Dirençlilik Düzeyinin Belirlenmesi

Çalışmada *L. plantarum* suşlarının metallere karşı minimal inhibisyon konsantrasyonlarının belirlenmesi amacıyla Cu, Cd, Zn, Fe, Co, Al ve Cr bileşikler 10000 ve 1000 ppm stok solüsyonları hazırlanarak kullanılmıştır. Buna göre her bir metal ultra saf su içerisinde çözüldükten sonra 0.45 µm membran filtrelerden geçirilerek sterilize edilmiştir. Hazırlanan bu stok metal solüsyonlarından 5 mL MRS sıvı besiyerini içeren tüplere önce 1, 10, 50, 100 ve 500 ppm ilave edilmiştir. Ardından metal içeren MRS sıvı besiyerine *L. plantarum* suşları %1 oranında aşılınmış ve 30°C 'de 18 saat inkübasyon uygulanmıştır. Inkübasyon neticesinde hiçbir bulanıklık tespit edilmeyen tüpteki konsantrasyon dikkate alınarak yeni metal konsantrasyonları test edilerek her bir metal için *L. plantarum* suşunun minimal inhibisyon konsantrasyonu belirlenmiştir.

***L. plantarum* Suşlarında Cu-transport-ATPaz (*copA*) ve Cd-transport-ATPaz (*cadA*) Genlerinin Taranması**

L. plantarum suşlarında Cu ve Cd ile ilişkili direnç genlerinin (*copA* ve *cadA*) varlığının belirlenmesi için öncelikle suşların genomik DNA'ları genomik DNA izolasyon kiti (Invitrogen) kullanılarak elde edilmiştir. Daha sonra *PcadA-F-5'*-ATGAGTGAGAAAATGACCGAA-3', *PcadA-R-5'*-AACTTTCATCAATCGTAATCC-3', ve *PcopA-F-5'*-AGCAATACCGAACTCGTGAC-3', *PcopA-R-5'*-TGCCACTACTGGCTAATATGA-3' primer çiftleri kullanılarak PZR ile genlere ait fragmentler çoğaltılmıştır. PZR karışımı 5 µL tampon, 2 µL dNTP karışımı (Fermentas), 1'er µL pA ve pH primerleri, 1µL Hi-Fi Taq DNA polimeraz (Fermentas) ve 5 µL genomik DNA'dan oluşturulmuş ve toplam hacim ultra steril saf su kullanılarak 50 µL'ye tamamlanmıştır. Bu şekilde hazırlanan tüplere Techne (UK) cihazında 95°C 5 dakika başlangıç denatürasyonunu takiben 30 çevrim 95°C 30 saniye, 53°C 30 saniye, 72°C 1 dakika ve son aşamada ise 72°C'de 10 dakika içeren bir program uygulanmıştır. PZR ürünleri (%1-2) Ethidium Bromide (Sigma, ABD) içeren agaroz jelde 30 dakika 100 V akımda ve 60°C sıcaklıkta yürütülmüş, UV ışığında görüntülenmiştir.

Cu-transport-ATPaz (*copA*) ve Cd-transport-ATPaz (*cadA*) Genlerinin Genlerinin Dizi Analizi ve Homolojisi

L. plantarum suşlarından PZR ile çoğaltılabilen DNA fragmentlerin temizlenmesi için PZR saflaştırma kiti (Invitrogen) kullanılmış ardından DNA dizi analizi REFGEN Biyoteknoloji ve Gen Araştırmaları Ltd. firması tarafından yapılmıştır. Elde edilen nükleotid dizileri NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) kütüphanesinden taranmış ve ilişkili genler ile karşılaştırılması yapılmıştır. Buna ilaveten benzer bulunan genlerle homolojisi MEGA6.06 hazır paket programı kullanılarak belirlenmiştir [13].

BULGULAR ve TARTIŞMA

Bu çalışmada beyaz peynir, sucuk, ekşi hamur ve turşu örneklerinden izole edilmiş ve tanımlanmış 43 adet *L. plantarum* suşlarının metal dirençlilik düzeyleri sırasıyla; Cu için 2-12 ppm, Cd için 2-15 ppm, Zn için 50-100 ppm, Fe için 50-400 ppm, Co için 25 -400 ppm, Al için 12-200 ppm ve Cr için 25 -200 ppm arasında bulunmuştur. Tablo 1'de görüldüğü gibi söz konusu suşlar Fe ve Co'a karşı diğer metallerden daha fazla dirençlilik göstermiştir. Cu ve Cd'ye karşı ise oldukça hassas oldukları gözlenmiştir. Tüm metallerle karşı en hassas suş *L. plantarum* PFC30 olurken, en dirençli olanlar ise turşu ve ekşi hamur kaynaklı *L. plantarum* PFC19, PFC22, PFC33 ve PFC36 olarak belirlenmiştir.

Metallerin LAB'ler üzerinde toksik etkili olduğu bilinmektedir. Ancak LAB türlerinin farklı konsantrasyonlardaki metalleri tolere edebildikleri ve özellikle çevrenin ve insan sağlığının korunması için probiyotik olarak kullanımları önerilmektedir [6, 8, 14].

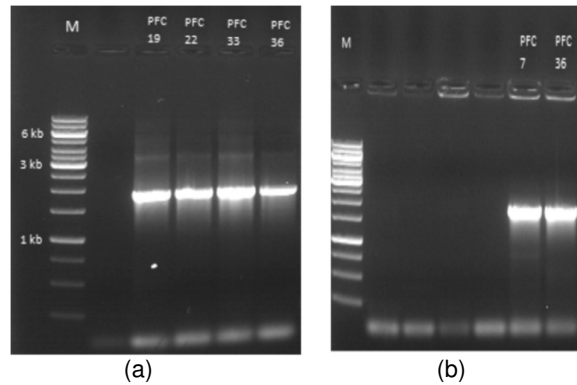
Mrvic ve ark. [7] yaptıkları çalışmada Cu⁺²'nin *L. plantarum* suşları üzerinde toksik olduğunu belirtmiştir. Diğer taraftan, başka bir çalışmalarında ise *L. plantarum* CCFM8246 suşunun 500 mg/L düzeyine kadar Cu⁺²'yi tolere edebildiği rapor edilmiştir. Cd toksisitesine karşı koruma amaçlı LAB taraması yapılan bir çalışmada, 4 adet *L. plantarum* suşlarının minimal inhibisyon konsantrasyonları <50 ila >1000 mg/L olarak tespit edilmiştir [15]. Yu ve ark. [16] çalışmalarında 30 farklı LAB'nin Al dirençliliğini ve adsorbe edebilme düzeylerini araştırmış, *L. plantarum* CCFM639 suşunun >2048 mg/L Al konsantrasyonunu tolere edebildiğini göstermiştir. Aynı çalışmada kullanılan 6 adet *L. plantarum* suşlarından en hassasının 256 mg/L Al minimal inhibisyon konsantrasyonu özelliğine sahip olduğu bulunmuştur. Buna göre mevcut çalışmalar ışığında ülkemiz çeşitli fermente gıdalarından izole edilmiş olan *L. plantarum* suşlarının Cu, Cd ve Al metallerine karşı direnç düzeyi daha düşük bulunmuştur. Ancak referans çalışmalarda da suşların geniş aralıklarda minimum inhibisyon değerlerinde davranış göstermesi, suşların izolasyon kaynağı ve suşa bağlı olarak metal dirençliliğinin değiştiğinin bir işaretidir.

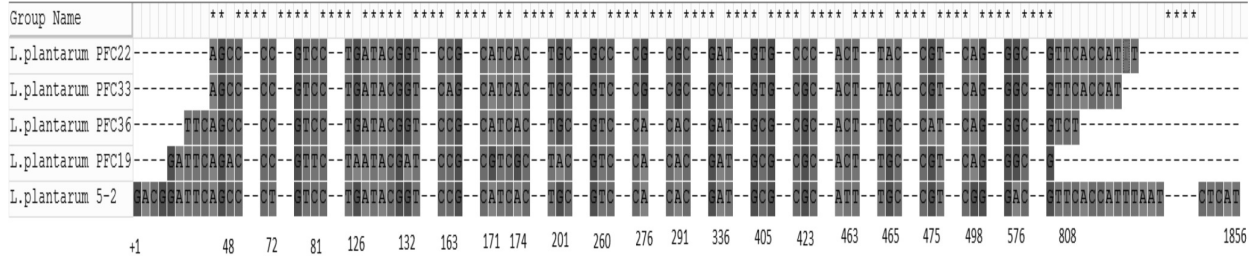
Bu çalışma kapsamında *L. plantarum* suşlarının genomunda, daha önce genom analizleri ile *L. plantarum*'un genomlarında olduğu tespit edilen Cu ve Cd dirençliliği ile ilişkili genlerin, varlığı da araştırılmıştır [17]. Cu-transport ATPaz (*copA*) ve Cd-transport-P-tipi ATPaz (*cadA*) genlerinin nükleotid dizilerine göre hazırlanan primerler kullanılarak *L. plantarum* suşlarının genomlarında yapılan PZR taramalarında, *L. plantarum* PFC19, PFC22, PFC33 ve PFC36 suşlarında *copA* ve *L. plantarum* PFC7 ve PFC36 suşlarında ise *cadA* genlerine ait 1900 bp fragmentler çoğaltılmıştır (Şekil 1). Buna göre *L. plantarum* PFC36 suşunun hem *copA* hem de *cadA* genlerini birlikte içerdiği tespit edilmiştir. Nitekim bu sonuç söz konusu suşun diğerlerine kıyasla daha yüksek metal direnç seviyesine sahip olduğunun nedenini açıklamaktadır.

L. plantarum suşlarının genomundan çoğaltılan *copA* ve *cadA* genlerinin DNA dizisi belirlenmiş ve NCBI veri tabanındaki mevcut genlerin dizisi ile kıyaslaması yapılmıştır. Buna göre *L. plantarum* PFC7 ve PFC36 suşlarından çoğaltılan *cadA* geninin DNA dizisi, Siezen ve ark. [17] tarafından rapor edilen *cadA* geniyle %100 homolog olduğu anlaşılmıştır. Ancak *L. plantarum* PFC19, PFC22, PFC33 ve PFC36 suşlarının *copA* geninin aynı araştırmacılar tarafından rapor edilen *cadA* geniyle farklı oranlarda homoloji göstermiştir (Şekil 2). Bu suşların içerdiği *cadA* genleri arasında *L. plantarum* 5-2 suşunun içerdiğiyle en yüksek benzerlik *L. plantarum* PFC36 suşunda bulunan *cadA* geni'dir. Çünkü *L. plantarum* 5-2 suşunda bulunan *copA* geniyle karşılaştırıldığında; *L. plantarum* PFC36 suşunun *copA* geninde 5, PFC19, PFC22 ve PFC33 suşlarındakiler ile ise sırasıyla 11, 10 ve 10 baz farklıdır. *L. plantarum* PFC19, PFC22, PFC33 ve PFC36 suşlarının *copA* geninin 4 bölgesinde (72., 463., 498. ve 576.) bazlar aynı iken, *L. plantarum* 5-2 suşunun içerdiği *copA* geninde aynı noktalarda farklı olduğu gözlenmiştir.

Tablo 1. Beyaz peynir, sucuk, ekşi hamur ve turşu örneklerinden izole edilen *L. plantarum* suşlarının metallere karşı gösterdikleri minimum inhibisyon konsantrasyonları (ppm)

<i>L. plantarum</i>	Cu	Cd	Zn	Fe	Co	Al	Cr	İzolasyon Kaynağı
PFC 02	2	15	50	200	200	100	50	Sucuk
PFC 07	6	15	100	400	400	100	100	Sucuk
PFC 08	4	10	100	400	400	100	100	Sucuk
PFC 10	4	10	100	400	400	100	100	Sucuk
PFC 24	4	4	50	100	400	50	50	Sucuk
PFC 25	2	4	100	400	400	100	50	Sucuk
PFC 11	4	6	50	50	400	50	25	Turşu
PFC 12	10	6	50	400	400	100	50	Turşu
PFC 14	10	4	50	200	400	100	50	Turşu
PFC 15	10	4	50	400	400	100	50	Turşu
PFC 16	6	4	50	400	400	100	50	Turşu
PFC 17	2	2	50	400	400	100	50	Turşu
PFC 18	2	4	100	400	400	100	50	Turşu
PFC 19	12	8	100	400	400	100	50	Turşu
PFC 20	6	6	100	400	400	100	100	Turşu
PFC 22	12	8	100	400	400	100	50	Turşu
PFC 23	2	4	100	400	400	100	50	Turşu
PFC 26	2	4	50	200	400	100	50	Ekşi Hamur
PFC 27	2	4	100	400	400	100	100	Ekşi Hamur
PFC 28	2	8	100	400	400	100	100	Ekşi Hamur
PFC 29	2	6	100	400	400	100	100	Ekşi Hamur
PFC 30	2	4	50	50	25	12	25	Ekşi Hamur
PFC 31	2	4	50	100	400	100	50	Ekşi Hamur
PFC 33	12	15	50	400	400	200	100	Ekşi Hamur
PFC 34	6	2	100	200	400	100	100	Ekşi Hamur
PFC 35	2	4	50	50	100	50	50	Ekşi Hamur
PFC 36	12	15	100	400	400	200	50	Ekşi Hamur
PFC 37	2	4	100	200	200	50	50	Ekşi Hamur
PFC 38	2	6	100	400	400	100	100	Ekşi Hamur
PFC 39	2	6	100	200	400	100	50	Ekşi Hamur
PFC 42	2	6	100	100	400	50	50	Ekşi Hamur
PFC 44	2	10	100	200	200	200	200	Peynir
PFC 45	2	4	50	200	200	200	200	Peynir
PFC 46	2	15	100	200	200	100	100	Peynir
PFC 47	2	10	50	200	200	200	200	Peynir
PFC 48	2	4	100	200	200	200	200	Peynir
PFC 50	2	2	100	200	200	100	100	Peynir
PFC 51	2	2	50	50	200	100	100	Peynir
PFC 52	2	4	100	200	200	200	200	Peynir
PFC 54	2	6	100	200	200	200	200	Peynir
PFC 55	2	2	50	200	200	100	50	Peynir
PFC 56	2	2	100	200	200	100	100	Peynir
PFC 57	2	2	100	200	200	50	20	Peynir

Şekil 1. *L. plantarum* suşlarından çoğaltılan Cu-transporter ATPaz (a) ve Cd-transport ATPaz (b) genlerine ait DNA fragmentlerinin PZR görüntüsü



Şekil 2. Gıda kaynaklı *L. plantarum* suşlarından izole edilen Cu-transport ATPaz geninin homolojisi. Rakamlar ilgili gen üzerinde baz farklılığını ve yerini göstermektedir.

SONUÇ

Bu çalışmada elde edilen sonuçlara göre, *L. plantarum* PFC7, PFC19, PFC22, PFC33 ve PFC36 suşlarının genetik temelli metal dirençlilik özelliklerinden oluşabilecek metal stresine karşı fermente gıdalarda starter kültür olarak uygulama potansiyeli bulunduğu tespit edilmiştir. Spesifik düzeyde metal dirençlilik düzeyleri belirlenen söz konusu suşların tek veya kombine şekilde insanların günlük diyetlerinde fermente ürünlerle beraber yer alması ile olası metal toksisiteye karşı güçlü bir biyokoruma da sağlanabilir.

KAYNAKLAR

- [1] Olaoye, O.A., Ntuen, I.G., 2011. Spoilage and preservation of meat: a general appraisal and potential of lactic acid bacteria as biological preservatives. *International Research Journal of Biotechnology* 2(1): 33-46.
- [2] Giller, K.E., Witter, E., McGrath, S., 1998. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: A review. *Soil Biology and Biochemistry* 30: 1389-1414.
- [3] Younan, S., Sakita, Z.G., Albuquerque, T.R., Keller, R., Bremer-Neto H., 2016. Chromium (VI) bioremediation by probiotics. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 96: 3977-3982.
- [4] Berger, B., Pridmore, C., Barretto, F., Delmas-Julien, K., Schreiber, F., Brussow, H., 2007. Similarity and differences in the *Lactobacillus acidophilus* group identified by polyphasic analysis and comparative genomics. *Journal of Bacteriology* 189(4): 1311-1321.
- [5] van Kranenburg, R., Golic, N., Bongers, R., Leer, R.J., de Vos, W.M., Siezen, R.J., Kleerebezem, M., 2005. Functional analysis of three plasmids from *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology* 71(3): 1223-1230.
- [6] Halttunen, T., Salminen, S., Tahvonen, R., 2007. Rapid removal of lead and cadmium from water by specific lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 114(1): 30-35.
- [7] Mrvacic, J., Butorac, A., Solic, E., Stanzer, D., Bacun-Druzina, V., Cindric, M., Stehlik-Tomas, V., 2013. Characterization of *Lactobacillus brevis* L62 strain, highly tolerant to copper ions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 29(1): 75-85.
- [8] Bhakta, J.N., Ohnishi, K., Munekage, Y., Iwasaki, K., Wei, M.Q., 2012. Characterization of lactic acid bacteria-based probiotics as potential heavy metal sorbents. *Journal of Applied Microbiology* 112(6): 1193-1206.
- [9] Chang, Y.C., Choi, D., Kikuchi, S., 2012. Enhanced extraction of heavy metals in the two-step process with the mixed culture of *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. *Bioresource Technology* 103(1): 477-480.
- [10] Schut, S., Zauner, S., Hampel, G., König, H., Claus, H., 2011. Biosorption of copper by wine-relevant lactobacilli. *International Journal of Food Microbiology* 145(1): 126-131.
- [11] Zhai, M., Wang, G., Zhao, J., Liu, X., Tian, F., Zhang, H., Chen, W., 2013. Protective effects of *Lactobacillus plantarum* CCFM8610 against acute cadmium toxicity in mice. *Applied and Environmental Microbiology* 79(5): 1508-1515.
- [12] Kinoshita, H., Ohtake, F., Ariga, Y., Kimura, K., 2016. Comparison and characterization of biosorption by *Weissella viridescens* MYU 205 of periodic group 12 metal ions. *Animal Science Journal* 87(2): 271-276.
- [13] Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30(12): 2725-2729.
- [14] Ibrahim, F., Halttunen, T., Tahvonen, R., Salminen, S., 2006. Probiotic bacteria as a detoxification tools, assessing their heavy metal binding isotherms. *Can Journal Microbiology* 52(9): 877-885.
- [15] Tian, F., Zhai, Q., Zhao, J., Liu, X., Wang, G., Zhang, H., Zhang, H., Chen, W., 2012. *Lactobacillus plantarum* CCFM8661 alleviates lead toxicity in mice. *Biological Trace Element Research* 150(1): 264-271.
- [16] Yu, L., Zhai, Q., Liu, X., Wang, G., Zhang, Q., Zhao, J., Narbad, A., Zhang, H., Tian, F., Chen, W., 2016. *Lactobacillus plantarum* CCFM639 alleviates aluminium toxicity. *Applied of Microbiology and Biotechnology* 100: 1891-1900.
- [17] Siezen, R.J., Francke, C., Renckens, B., Boekhorst, J., Wels, M., Kleerebezem, M., Van Hijum, S.A., 2012. Complete resequencing and reannotation of the *Lactobacillus plantarum* WCFS1 genome. *Journal of Bacteriology* 194(1): 195-196.