# تأثیر *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بر جمعیت میکروبی خیارهای تخمیری ایرانی

**زهرا نیلچیان[۱]، سید هادی رضوی[۲]، ابراهیم رحیمی[۳*]**

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، دانشکده کشاورزی، دانشجوی کارشناسی ارشد رشته مهندسی صنایع غذایی، شهرکرد، ایران.
۲- دانشیار گروه صنایع غذایی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
۳- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، دانشکده کشاورزی، دانشیار گروه صنایع غذایی، شهرکرد، ایران.
*نویسنده مسئول مکاتبات:ebrahimrahimi55@yahoo.com
(دریافت مقاله: ۹۱/۳/۲۰ پذیرش نهایی: ۹۲/۱/۲۰)

## چکیده

**تخمیر خیار یک فرآیند طبیعی می‌باشد که میکرواورگانیسم‌های آن در کیفیت محصول مؤثرند و در این محصول گونه‌های متعلق به گروه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* دارای مزیت‌های بسیاری برای فرآیند تخمیر می‌باشند. در این بررسی برای تولید محصولی ایمن و یکنواخت، خیارهای بومی درمحلول‌های آب نمک ۵ و ۷٪ کلرید سدیم تحت شرایط بدون تلقیح و نیز $۶\times۱۰^{۸}$cfu/ml، $۴\times۱۰^{۷}$، $۴\times۱۰^{۶}$ماده تلقیح از گونه خاص*لاکتوباسیلوس پلانتاروم*قرار داده شدهوسپس جمعیت میکروبی برای پانزده روز تخمیر در دمای محیطو سی روز انبار در دمای ٤ و ۲۵ درجه سلسیوسبا استفاده از آنالیز واریانس در سطح اطمینان ۹۵٪ بررسی شده است. در این بررسی، در روز نهم تخمیر نمونه‌هایبا میزان تلقیح بالا ($۶\times۱۰^{۸}$ cfu/ml) و دارای ۵٪ محلول کلرید سدیمبیشترین میزان جمعیت *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* ($۸/۵۷$ $\log_{10}$ cfu/ml)را نشان داده اند.اما با میزان تلقیح بیشتر و غلظت نمک ۷٪ حداقل میزان مخمر و مزوفیل هوازیدر نمونه‌ها مشاهده شده است. در طولانبار، جمعیت *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، مخمرها و مزوفیل‌های هوازی در دمای ۲۵ درجه بالاتر از دمای٤درجه سلسیوسبوده استاماتغییر مهم در روز سی‌ام انبارمشاهدهشده است که میزان*لاکتوباسیلوس پلانتاروم*($۵/۴۷$ $\log_{10}$ cfu/ml)در محلول نمک ۷٪ و دمای ٤ درجه سلسیوسبا شرایط رقابتی کمتر و محیطی مناسب نسبت به دیگر میکرواورگانیسم‌ها بالاتر بوده است.بنابراین در این بررسی با رشد مناسب *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و جلوگیری از رشد میکرواورگانیسم‌های بیماری‌زا و غیربیماری‌زا در نمونه‌های تلقیح شده،محصولی ایمن و یکنواخت تولید شده است.**

**واژه‌های کلیدی:** *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، خیارهای تخمیری، جمعیت میکروبی

## مقدمه

سبزیجات تخمیرشده به دلیل حضور اسیدلاکتیک از جمله محصولات ایمن می‌باشند اما مواد خام آن‌ها می‌توانند به راحتی با باکتری‌های بیماری‌زا مانند *اشریشیاکولی ولیستریا منوسیتوژنز* آلوده شوند( Penas et al., 2010).به طور کلی تخمیر خیار یک فرآیند طبیعی می‌باشد کهاز رقابتباکتری‌های لاکتیکی، مخمرها و نیز دیگر میکرواورگانیسم‌ها نتیجه می‌یابد(Garrido-Fernandez et al., 1997). در یک تخمیر طبیعی وجود باکتری‌های لاکتیکی و مخمرها می‌توانند ویژگی‌های محصول نهایی را تعیین کنند، بنابراین هنگامی که باکتری‌های لاکتیکینسبت به مخمرها افزایش یابند تخمیر اسیدلاکتیک برای تولید یک محصول با pH پایین مطلوب می‌شودکه این اتفاق برای یک محصول تخمیر شده به صورت طبیعی لازماست ( Panagou et al., 2008).

در بررسی‌های انجام شده روی سویه‌های مختلف باکتری‌های لاکتیکی مشخص شده است که این سویه‌ها می‌توانند اسیدهای آلی و باکتریوسین‌ها را ایجاد وبا میکروب‌های آلوده کننده رقابت کنند( Lucke, 2000).یکی از سویه‌های مهم باکتری‌های لاکتیکی،*لاکتوباسیلوس پلانتاروم* می‌باشد کهدر بررسی آب نمک محصولات تخمیری مشاهده شده است که می‌تواند فعالیت کند و در نتیجه اسیدلاکتیک مورد نیاز برای حفاظت محصولات را تولیدنماید (Leal-Sánchez et al., 2003). علاوه بر آن استفاده از کشت‌های مناسب*لاکتوباسیلوس پلانتاروم*می‌تواند تولید اسیدلاکتیک را افزایش دهد و کنترل میکروبی فرآیند را بهبود بخشد(Garrido Fernandez et al., 1995).

کشت‌های استارتر استفاده شده در تخمیر سبزیجات می‌توانند در به دست آوردن یک فرآیند کنترل شده کمک کنند(Panagou et al., 2008)و بسیاری از عملیات‌های سنتی رابرای رسیدن به اهداف اقتصادی گسترش دهند.به دلیل عدم استفاده از کشت‌های استارتر در محصولات تخمیری در ایران هدفازاینمطالعهارزیابیاثرکشت استارتر *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* انتخاب شده بر روی ویژگی‌های میکروبی خیار تخمیر شده ایرانی می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

### الف) آماده‌سازی نمونه‌های خیار

برای این بررسی، ۱۵ گیلوکرمخیار از گونه‌های آلفا به رنگ سبز روشن و ترد خریداری شدند و بعد از شستشو با آب شهری، داخل ٢٤ عدد شیشه‌های ٤٥٠ گرمیقرار گرفتند. سپس روی آنها محلول آب نمک ۵٪ و ۷٪ وزنی- حجمی با استفاده از نمک معدنی کلرید سدیم (NaCl)(خلوص ۹۹٪) و pH حدود ٤ با استفاده از سرکه خوراکی ۰/۲ نرمال ریخته شد. لازم به ذکر است کهمحلول های آب نمکباpH اسیدی در ۷۳ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه پاستوریزه و بعد از سرد شدن تا دمای ۳۰ درجه سلسیوس، داخل شیشه‌ها به میزان ۳۰۰ تا ۳۵۰ میلی لیتر ریخته شدند.

### ب) آماده‌سازی ماده تلقیح

سویه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* مورد استفادهاز نمونه خیارشورهای محلی جداسازی و با روشPCR با پرایمرهای LPL-1/LPL-2(GAAACCTACACACTCGTCGA/CCTGAACTGAGAGAATTTG)شناسایی شده ودر تیوب‌های گلیسیرینه در ۸۰- درجه سلسیوس نگه‌داری شده بود

(Tsai et al., 2010; Kabadjova et al., 2002).برای انجام آزمایش ابتدا دو عدد از تیوب گلیسیرینه باکتری مورد نظر در ۲۰ میلی لیتر محیط کشت MRSمایع استریل فعال‌سازی و در ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۲٤ ساعت گرم‌خانه گزاری شد. بعد از مشاهده رشد و فعال شدن گونه مورد نظر، با سانتریفوژ کردن محیط کشت دو فاز مایع و جامد از هم جدا شدند و رسوبات باقی‌مانده به ۱۵۰ میلی‌لیتر محلول آب نمک استریل ٤/٥٪ (وزنی– حجمی کلرید سدیم)با pHحدود ٤ منتقل شدند.pHمحلول با سرکهخوراکی تنظیم شد. سپس نمونه ورتکس و در ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۲٤ ساعت گرم‌خانه‌گزاری شد( Castro et al., 2002; Panagou et al., 2008).

**ج) تلقیح باکتری به نمونه‌ها**

همه نمونه‌های خیار آماده شده، با دو نوع محلول آب نمک تحت ٤ نوع تیمار که هر کدام در ٦ عدد شیشه قرار گرفتندکه شامل **a**)تخمیر بدون تلقیح،**b**)تخمیر با$٤\times١٠^{٦}$cfu/ml، **c**)تخمیر با $٤\times١٠^{٧}$cfu/ml و **d**)تخمیر با$٦\times١٠^{٨}$cfu/ml ماده تلقیح بودند. بعد از آماده‌سازی شیشه‌های خیار، تلقیح و درب‌بندی تحت شرایط استریل انجام گرفت و سپس نمونه‌ها در دمای ۲۵ درجه سلسیوس گرم‌خانه‌گذاری شدند. شمارش کل باکتری-های مزوفیل هوازی، مخمر و باکتری‌های لاکتیکی در طی پانزده روز تخمیر و جمعیت باکتری‌های بیماری‌زا در پایان روز تخمیربررسی شدند. بعد از تکمیل تخمیر، ۳٪ محلول نمک (وزنی-حجمی کلرید سدیم) به بهترین نمونه‌های مورد نظر اضافهشدندو سپستعداد باکتری‌های لاکتیکی، مخمر و مزوفیل‌های هوازی این نمونه‌ها در دمای ٤ و ۲۵ درجه سلسیوسدر طول سی روز از انبار بررسی شدند.

**د) آنالیز میکروبی در طی تخمیر**

آنالیز میکروبی در نمونه‌های آب نمک یک روز بعد از تلقیح شروع و در طی ۱۵ روز تخمیر انجام شدند. برای این کار ۱میلی لیتر از محلول آب نمک هموژن شده از تیمارهای مختلف تحت شرایط استریل به ۹ میلی لیتر آب مقطر استریل اضافه شد و رقت‌سازی اعشاری در محلول رقیق‌کننده انجام گرفت (Paramithiotis et al., 2010). ۰/۱ میلی لیتر از نمونه‌های رقیق شده بطور سطحی بر روی محیط‌هایMRS آگار (Merck, Darmstadt, Germany) طبق روش‌های زیر کشت داده شد:روش کشت سطحی با پخش ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول آب نمک رقیق شده بر روی محیط کشت MRS آگار برای شمارش باکتری‌های زنده لاکتیکیدردمای ۲۵ درجهسلسیوس به مدت ٤۸-۲٤ ساعت، محیطسابروز دکستروز آگار برای شمارش سلول زنده کپک و مخمر در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ٤۸ساعت و محیط نوترینت آگار (Merck, Darmstadt, (NA) Germany)برای شمارش کل سلول‌های مزوفیل هوازی در ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ٤۸ ساعت انجام شدند(Paramithiotis et al., 2010). بعد از گذشت۱۵ روز از تخمیر، حضور *لیستریامونوسیتوژنز* طبق روش زیر مورد بررسی قرار گرفت. برای بررسی باکتری*لیستریامونوسیتوژنز* بدون تهیه رقت، حدود ۰/۵ میلی‌لیتر از آب نمک نمونه‌های تخمیر شده به محیط مایع غنی کننده لیستریا (Listeria Enrichment Broth, (Himedia, India) اضافه و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۷۲ ساعت گرم‌خانه‌گزاری شدند.

سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از این محیط مایع بر روی محیط انتخابی لیستریا (Listeria Selective Agar (Himedia, India)به طور سطحی کشت دادهشدند و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۴۸-۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گزاری شدند. برای بررسی *استافیلوکوکوس اورئوس* نیز ۰/۱ میلی لیتر از نمونه‌های آب نمکی بر روی سطح محیط انتخابی برد پارکر آگار (BPA) (Merck, Darmstadt, Germany)کشت داده شدند و در دمای ۳۷ درجه سلسیوسبه مدت ۴۸-۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گزاری شدند. برای بررسی گونه ویبریو نیز ۰/۱ میلی لیتر از نمونه‌های آب نمک بر روی سطح محیط TCBS آگار (Thiosulfate-Citrate-Bile-Salt-sucrose Agar)(Merck, Darmstadt, Germany)کشت و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس برای۴۸-۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گزاری شدند (Panagou et al., 2008; Paramithiotis et al., 2010).

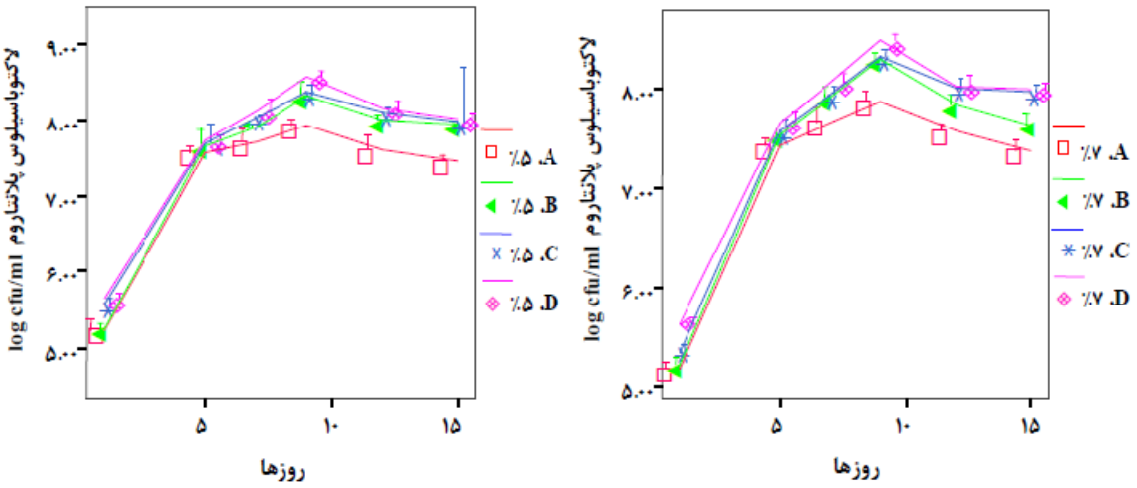
**ه) آنالیز آماری**

همه آنالیزها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS۱۱/۵ انجام گرفت. آنالیز واریانس برای بررسی کلی میزان اختلاف و دانکن برای بررسی اختلاف در میان تیمارها در سطح اطمینان ۹۵ درصد مورد بررسی قرار گرفت.

## یافته‌ها

**الف) تغییرات میکروبی در طول تخمیر**

به طور کلی تغییرات میکروبی در طول تخمیر در نمودار ۱ارائه شده است. بر اساس آنالیز واریانس اختلاف معنی‌داری در سطح اطمینان ۹۵٪ در بین نمونه‌ها از نظر میزان جمعیت *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* $log_{10}$cfu/mlدر طول تخمیر وجود داشته است(P<۰/۰۵).




نمودار ۱- تغییرات جمعیت *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در طول تخمیر در نمونه‌ها با ماده تلقیح متفاوت در دو نوع محلول نمک ۵ و ۷٪

صرف نظر از غلظت محلول نمک، نمونه‌های نوع dبیشترین میزان *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*را داشته‌اند. به ترتیب در نمونه‌های c،b،a وdموجود در ۵٪ محلول نمک جمعیت *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*بیشتری نسبت به نمونه‌های موجود در ۷٪ محلول نمک وجود داشته است. در مورد نمونه‌هایc،b،a و dدارای ۷٪ محلول نمک میزان جمعیت *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*با سه بار تکرار در کل نسبت به نمونه‌های دارای ۵٪ محلول

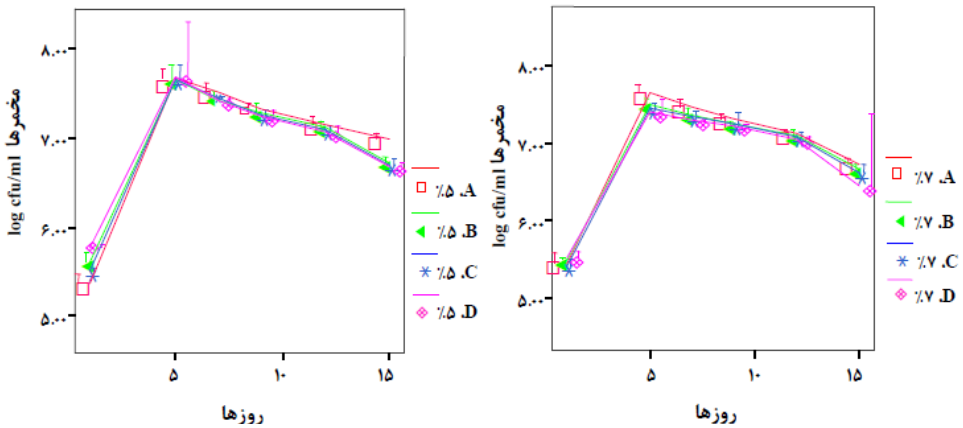
نمک با میزان تلقیح یکسان کمترمی‌باشد که این تغییرات در روز نهم قابل توجه و دارای اختلاف معنی‌داری بوده است(جدول۱). در بین تغییرات در طی روزهای تخمیر در کل نمونه‌هایc و d بیشترین میزان جمعیت *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*را داشته‌اند و از روز هفتم تا پانزدهم صرف نظر از میزان نمک، نمونه‌های دارای مقدار تلقیح بیشتر میزان *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*بالاتری را نسبت به بقیه تیمارها داشته‌اند که از این نظر نمونه‌های dموجود در ۵٪ محلول نمک میزان *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*آنها از نمونه‌های دارای ۷٪ محلول نمک بالاتر بوده است. همین ترتیب را در تیمارهای با ماده تلقیح یکسان نیز مشاهده می‌کنیم.

جدول۱- بررسی میزان جمعیت میکروبی ($log_{10}$ cfu/ml) در تیمارهای مختلف در روز نهم تخمیر

| میکرواورگانیسم‌ها | ٪۵- a* | ٪۵–b | ٪۵–c | ٪۵–d | ٪۷–a | ٪۷– b | ٪۷– c | ٪۷– d |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ***لاکتوباسیلوسپلانتاروم*** | ۷/۹۳±۰/۰۰۶$^{f}$ | ۸/۳۲±۰/۰۰۵$^{d}$ | ۸/۳۸±۰/۰۰۶$^{c}$ | ۸/۵۷±۰/۰۰۵$^{a}$ | ۷/۸۸±۰/۰۰۳$^{g}$ | ۸/۳۰±۰/۰۰۵$^{e}$ | ۸/۳۲±۰/۰۰۶$^{d}$ | ۸/٤۸±۰/۰۰۵$^{b}$ |
| **مخمرها** | ۷/۳۲±۰/۰۰۶$^{e}$ | ۷/۲۸±۰/۰۰۶$^{c}$ | ۷/۲۵±۰/۰۰۶$^{b}$ | ۷/۲٤±۰/۰۰۵$^{b}$ | ۷/۳۰±۰/۰۰۳$^{d}$ | ۷/۲۵±۰/۰۰۵$^{b}$ | ۷/۰۷±۰/۰۰۳$^{b}$ | ۷/۰۵±۰/۰۰۳$^{a}$ |
| **مزوفیل‌های هوازی** | ۷/۲۳±۰/۰۰۵$^{g}$ | ۷/۱۸±۰/۰۰۵$^{f}$ | ۷/۱٤±۰/۰۰۶$^{e}$ | ۷/۱۱±۰/۰۰۵$^{d}$ | ۷/۳۰±۰/۰۰۶$^{h}$ | ۷/۰۳±۰/۰۰۵$^{c}$ | ٦/۹٤±۰/۰۰۶$^{b}$ | ٦/۳٤±۰/۰۰۵$^{a}$ |

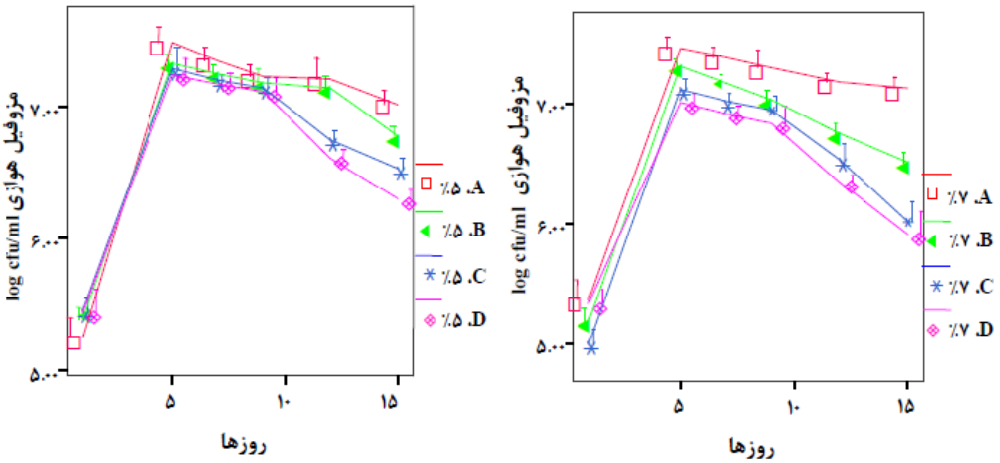
* تیمارهای مختلف با میزان درصد نمک استفاده شده در محلول‌ها با سطح اطمینان ۹۵٪.

میزان مخمرهابر روی محیط کشت سابروز دکستروز آگار با توجه به رقت‌های تهیه شده از هر تیمار بر طبق آنالیز آماری اختلافمعنی‌داری را در طول یک روز مشخص از تخمیرداشته‌اند. از روز اول تا روز پنجم تخمیر، جمعیت مخمرها در همه تیمارها افزایش یافته است و بعد از این روز کاهش آهسته مخمرها در طی تخمیر مشاهده شده است. در روز نهم میزان جمعیت مخمرها در نمونه‌های dدارای ۷٪ محلول نمککمتر از نمونه‌های دارای ۵٪ محلول نمک با تلقیح یکسان بوده است(جدول۱). در این روز بر اساس دانکن اختلافی در نمونه‌هایd و c دارای ۵٪ محلول نمک با نمونه‌های b و cدارای ۷٪ محلول نمک وجود نداشته است. به طور کلی نمونه بدون تلقیح در محلول ۵٪ نمک بالاترین میزان مخمر را در طول تخمیر نشان داده است. از روز دوازدهم تا پانزدهم کاهش مخمرها با سرعت تقریباً بیشتری انجام شده است. در طول تخمیر در هیچ‌کدام از نمونه‌ها، کپکی مشاهده نشده است.




نمودار ۲- تغییرات جمعیت مخمرها در طول تخمیر در نمونه‌ها با ماده تلقیح متفاوت در دو نوع محلول نمک ۵ و ۷٪

میزان باکتری‌های مزوفیل هوازی بر روی محیط کشت نوترینت آگار بر طبق آنالیز آماری اختلاف معنی‌داری رادر طول تخمیر داشته است. در روز اول به طور کلی جمعیت باکتری‌های مزوفیل هوازی در همه تیمارها کمترین میزان جمعیت را در طول روزهای تخمیر به خود اختصاص داده‌اند. در روز نهم نمونه‌هایd و cکمترین میزان باکتری مزوفیل را نسبت به بقیه تیمارها داشته‌اند و نمونه bدارای ۷٪ محلول نمک میزان باکتری مزوفیل کمتری را نسبت به نمونه‌هایd و c دارای ۵٪ محلول نمک نشان داده است(جدول۱). در این روز نمونه‌های بدون تلقیح در محلول ۷٪ و ۵٪ نمک بالاترین میزان باکتری مزوفیل را داشته‌اند. صرف نظر از میزان محلول اولیه نمک، هر چه میزان تلقیح بالاتر باشد میزان باکتری مزوفیل کمتر بوده است. بیشترین میزان جمعیت باکتری مزوفیل در همه تیمارها در روز پنجم (۷/۴۸ –۷/۰۱$\log_{10}$ cfu/ml) مشاهده شده است که در ادامه در روزهای بعدی تخمیر میزان این جمعیت در روز پانزدهم کاهش یافته است.



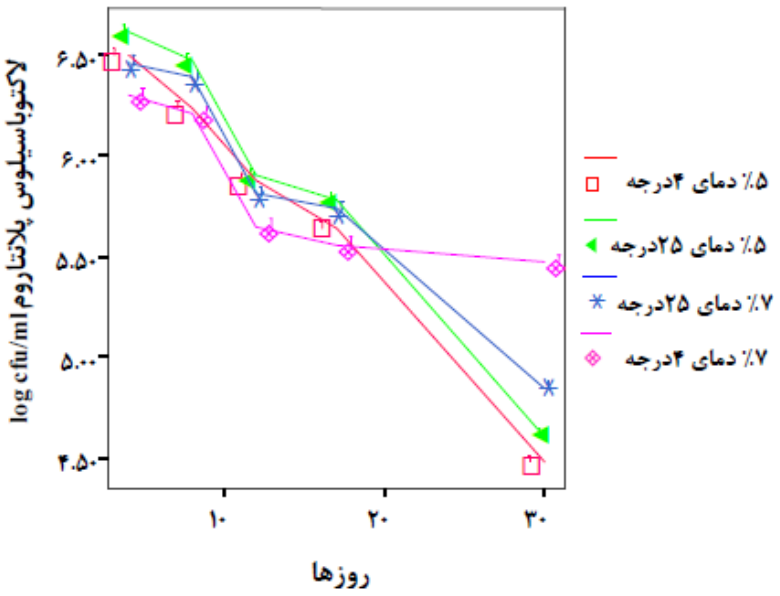

نمودار۳- تغییرات جمعیت مزوفیل هوازی در طول تخمیر در نمونه‌ها با ماده تلقیح متفاوت در دو نوع محلول نمک ۵ و ۷٪

**ب) میزان باکتری‌های بیماری‌زا در نمونه‌های تخمیر شده**

در این بررسی در همه ظروف خیارهای تخمیر شده به همراه تلقیح و یا بدون تلقیح بعد از روز پانزدهم تخمیر، سطوح قابل تعیین *لیستریا منوسیتوژنز*،*استافیلوکوکوس اورئوس* و ویبریو بر روی سطح پلیت‌ها مشخص نشد و رشد سلولی مورد مشاهده قرار نگرفت.

**ج) تغییرات میکروبی در طول انبار**

میزان تغییرات میکروبی در طول سی روز انباردر دو دمای مختلف در نمودار ٤ ارائه شده است. در بررسی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*بر طبق آنالیز واریانس اختلاف معنی‌داری در سطح اطمینان ۹۵٪ در تیمارهای مختلف در طول انبار در دو دمای مورد نظر مشاهده شده است. در روز چهارم در غلظت نمک برابر، نمونه‌های انبار شده در دمای ۲۵ درجه سلسیوس بالاترین میزان *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*را نسبت به دمای ٤ درجه سلسیوس داشته‌اند. بالاترین جمعیت *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*در محلول نمک ۵٪ و در ادامه در محلول نمک ۷٪ در دمای ۲۵ و ٤ درجه سلسیوس بوده است ودر روز سی‌ام انبار تفاوت بزرگ نسبت به روزهای دیگر انبار نمونه‌های دارای ۷٪ محلول نمک در دمای ٤ درجه سلسیوس بوده‌اند که میزان *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*بالاتری را داشته‌اند(جدول۲). به طور کلی هر تیمار در روزهای انبار در دو دمای مختلف، کاهش در جمعیت *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*را نشان داده‌اند که این کاهش در تیمارها از روز هفدهم تا سی‌ام،به جزء در محلول نمک ۷٪ در دمای ٤ درجه سلسیوس، با سرعت بیشتری انجام شده است.



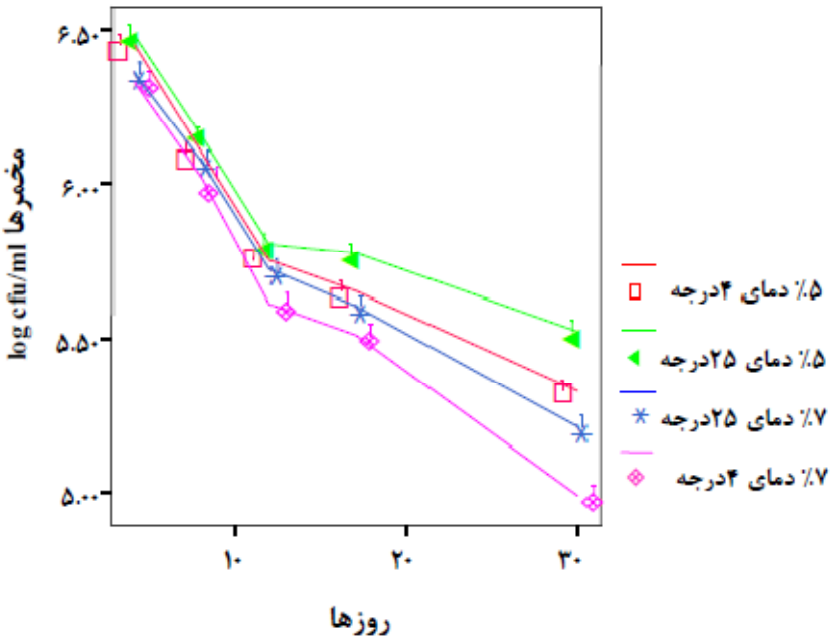

نمودار ۴- تغییرات *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در طول انبار در دو دمای ۴ و ۲۵ درجه سلسیوس در دو نوع محلول نمک ۵و ۷٪

جدول۲- میزان جمعیت میکروبی ($log_{10}$ cfu/ml)در تیمارهای با تلقیح بالا در روز سی‌ام انبار

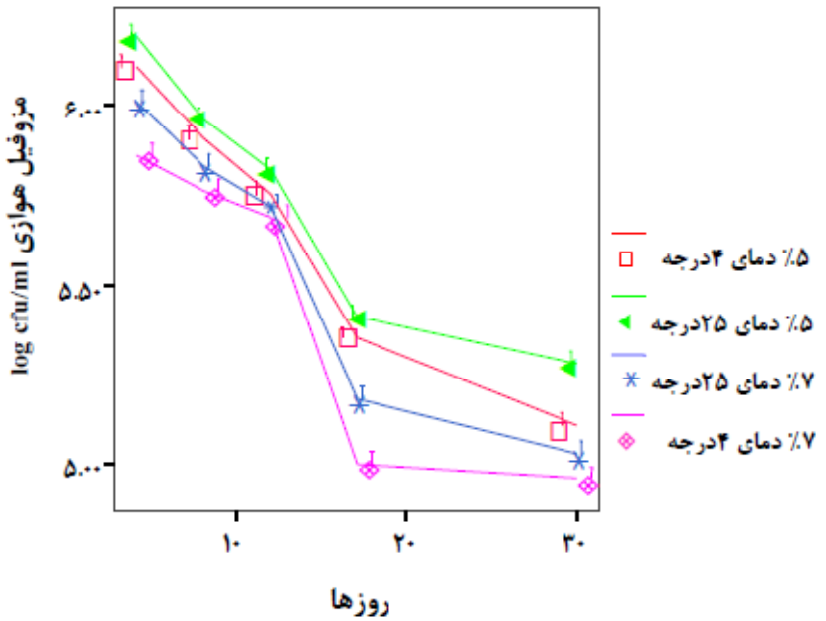
| میکرواورگانیسم‌ها | ٪۵-۴$^0$C* | ٪۵-۲۵$^0$C | ٪۷-۲۵$^0$C | ٪۷- ۴$^0$C |
|---|---|---|---|---|
| ***لاکتوباسیلوس پلانتاروم*** | ٤/٤٨±٠/٠٠٦$^d$ | ٤/٦١±٠/٠٠٦$^c$ | ٤/٨٥±٠/٠٠٣$^b$ | ٥/٤٧±٠/٠٠٣$^a$ |
| **مخمرها** | ٥/٣٣±٠/٠٠٦$^c$ | ٥/٥٢±٠/٠٠٣$^d$ | ٥/٢١±٠/٠٠٦$^b$ | ٤/٩٩±٠/٠٠٦$^a$ |
| **مزوفیل‌های هوازی** | ٥/١١±٠/٠٠٣$^c$ | ٥/٢٨±٠/٠٠٣$^d$ | ٥/٠٣±٠/٠٠٤$^b$ | ٤/٩٦±٠/٠٠٣$^a$ |

*تیمارها با تلقیح بالا در دو غلظت نمک و در دو دمای مختلف

در بررسی مخمرها بر طبق آنالیز آماری اختلاف معنی‌داری در تیمارهای مختلف مشاهده شده است. به طور کلی در هر غلظت محلول نمک، نمونه‌های انبار شده در دمای ٤ درجه سلسیوس تعداد مخمر کمتری را داشته‌اند(جدول۲).بررسی باکتری‌های مزوفیل هوازی همانند بررسی مخمرها، بر طبق آنالیز واریانس اختلاف معنی‌داری($P<۰/۰۵$).را در تیمارهای مختلف نشان داده‌اند و به طور کلی نمونه‌های انبار شده در دمای ٤ درجه سلسیوس تعداد باکتری‌های مزوفیل هوازی کمتری را داشته‌اند.




نمودار ۵- تغییرات مخمرها در طول انبار در دو دمای ۴ و ۲۵ درجه سلسیوس در دو نوع محلول نمک ۵و ۷٪




نمودار ۶- تغییرات باکتری مزوفیل هوازی در طول انبار در دو دمای ۴ و ۲۵ درجه سلسیوس در دو نوع محلول نمک ۵و ۷٪

## بحث و نتیجه‌گیری

در بررسی تغییرات میکروبی در طول تخمیر می‌توان گفت که در این تحقیق در حقیقت گونه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در نمونه‌هایتلقیح شده دارای غلظت نمک ۵ درصد، فعالیت بیشتری را نشان داده است هر چند که در بررسی‌های دیگر، فعالیت این باکتری در غلظت نمک بین ۰/۵ تا ۱۰ درصد نیز بیان شده است( Plengvidhya et al., 2007; Milesi et al., 2008). غلظت نمک به طور غالب و در ادامه مقدار تلقیح اثر موثر خود را روی میزان رشد *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*نشان داده‌اند که جمعیتسویه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*تلقیح شده بخش مهمی از کل جمعیت باکتری‌های لاکتیکیبوده و تا انتهای فرآیند حضور داشته است که نتایج مشابه نیز توسط محققان دیگر به دست آمده است(Bautista-Gallego et al., 2010). کشت استارتر استفاده شده در این مطالعه تعداد بالای سلولباکتری لاکتیکی را در حین تخمیر و انبار ضمانت کرده است که علاوه بر این تحقیق، افزایش رشد سریع کشت‌های استارتر و نیز *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در آب نمک نمونه‌های زیتون نیز مشاهده شده است که مشابه این تحقیق تعداد آنها بیشتر از نمونه‌های بدون تلقیح بوده است(Leal-Sánchez et al., 2003). نمونه‌های دارای تلقیح بیشتر در محلول نمک ۷٪، جمعیت مخمر و اسیدلاکتیک باکتری کمتری را نسبت به نمونه‌های دارای ۵٪ محلول نمک داشته‌اند کههمان طور که در تحقیقات دیگر نیز بیان شده است غلظت نمک بالا اثر مؤثری را روی کاهش رشد میکرواورگانیسم‌های نامناسب داشته است(Chammem et al., 2005).در مورد اثر میزان تلقیح بالا روی جمعیت مخمرها در این تحقیق روی خیارشور و در تحقیقات قبلی روی زیتون نیز مشخص شده است که در نمونه‌های بدون تلقیح در اصل تخمیر توسط مخمرها انجام شده است به جزء در

نمونه‌های دارای اسیدیته بالا که محیط برای تخمیر توسط باکتری‌های لاکتیکی مناسب شده است (Abriouel et al., 2011)که در این میان می‌توان به نقش بسیار مهم باکتری‌های لاکتیکی در محدود کردن اثرات منفی مخمرهای فساد بر روی کیفیت محصول اشاره کرد(Ozay and Borcakli, 1996).

کاهش در مقدار pH و افزایش باکتری لاکتیکی به جلوگیری از فعالیت دیگر میکرواورگانیسم‌های موجود نیز کمک می‌کند که در تحقیقات دیگر مزوفیل هوازی از روز دوم تخمیر (Sanchez et al., 2000) و در این تحقیق از روز پنجم تخمیر کاهش یافته است. تلقیح نژاد *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در ابتدا از جمعیت لاکتوباسیل‌های وحشی جلوگیری کرده و به عنوان جمعیت اصلی تا انتهای تخمیر باقی‌مانده است که مشابه این نتایج در تحقیقات دیگر علاوه بر جمعیت لاکتوباسیل‌های وحشی برای رشد کوکسی‌ها نیز مشاهده شده است(Leal-Sanchez et al., 2003).

در این تحقیق رشد مناسب باکتری لاکتیکی توانسته است از رشد باکتری‌های بیماری‌زا جلوگیری کند. همان طور که در تحقیقات دیگر مشخص شده است *لیستریا منوسیتوژنز* یک میکرواورگانیسم بیماری‌زا در محصولات غیراسیدی نگه‌داری شده در یخچال و نیز در تخمیر آب خیار (Romick, 1994) می‌باشد و در بعضی از سبزیجات تخمیری مانند زیتون سبز، با وجود pH پایین و غلظت نمک بالا این باکتری نیز وجود داشته است(Caggia et al., 2004). علاوه بر آن در تحقیقات دیگر فعالیت باکتری بیماری‌زا مانند ویبریو فقط در ابتدای تخمیر تعیین شده است که در این میان می‌توان بیان کرد کهpH پایین و محیط بی‌هوازی برای بقای این آلودگی‌ها مناسب نمی‌باشد( Abriouel et al., 2011)و مقدار جمعیت اولیه باکتری‌های لاکتیکی، مقاومت نمک و اسید و تولید باکتریوسین توسط آنها سبب موفقیت این باکتری‌هادر سبزیجات تخمیری در جلوگیری از فعالیت باکتری‌های بیماری‌زا شده است(Singh and Ramesh, 2008).وجود میزان زیاد *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در این تحقیق توانسته است از رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* نیز جلوگیری نماید همان طور که در تحقیقات دیگر، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*ایزوله شده از سبزیجات تخمیری بومی توانایی فعالیت ضدمیکروبی را در مقابل *استافیلوکوکوس اورئوس*نشان داده است (Tamang et al., 2009).تولید پلانتاریسین توسط *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*یکی دیگر از عواملی است که در کنترل مؤثر لاکتوباسیل‌های ذاتی و دیگر میکرواورگانیسم‌ها شرکت می‌کند (Leal-Sanchez et al., 2003). در یک بررسی روی سویه‌های خاص *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*نیز مشخص شده است که بیشترین میزان باکتریوسین در مقابل گرم منفی‌ها بعد از ۱۹ ساعت در محیط کشت حاویMRS بوجود آمده است(Todorov and Dicks, 2005).

در طول انبار جمعیت مخلوط باکتری لاکتیکی بویژه لاکتوباسیلوس و مخمرها در غلظت کلرید سدیم کمتر از ۷٪ با میزان بیشتری وجود داشته‌اند که مشابه با تحقیقات دیگر در محصول تخمیری با تسلط مخمرها،pH محصول می‌تواند افزایش یابد(Tsapatsaris and Kotzekidou, 2004). علاوه بر آن به دلیل دمای بهینه رشد مخمرها در ۲۵ درجه سلسیوس، نمونه‌های موجود در هر دو محلول نمک در دمای ٤ درجه سلسیوس، جمعیت مخمر ومزوفیل

هوازی کمتری را نسبت به ۲۵ درجه سلسیوس داشته‌اند. محققان دیگر کاهش در حدود ٦ $log_{10}$cfu/ml را برای بعضی از گونه‌های مخمر در طول ۹۰ روز انبار در ٤ درجه سلسیوس و تعداد اسیدلاکتیک باکتری را در حدود ۹$log_{10}$cfu/mlدر مدت ۷۲ ساعت اول در سبزیجات تخمیری و سپس کاهش آن به حدود۱$log_{10}$cfu/mlدر طول ۹۰ روز انبار در ٤ درجه سلسیوس را گزارش داده‌اند( Gardner et al., 2001).پروفایل بقاء *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در عصاره‌های جو و گندم انبار شده در ٤ درجه سلسیوس برای بیش از ۷۰ روز نیز مشخص شده است که سطوح اسیدلاکتیک در غذاهای تخمیری، روی پایداری اسیدی لاکتوباسیل مؤثر است( Charalampopoulos et al., 2003)و وجود میزان بالاتر و مناسب اسیدلاکتیک می‌تواند سبب بقاء سلول لاکتیکی در ٤ درجه سلسیوس شود (Charalampopoulos and Pandiella, 2010).در تخمیر سنتی مخمرها فوراً در ابتدای آب نمک‌زنی مشخص نمی‌شوند و در طول انبار افزایش آنها مشاهده می‌شود اما کلرید سدیم و اسیدتیه می‌توانند سبب ایجاد مقدارهای مینیمم آنها شوند و علاوه بر آن تعداد مخمرها به علت کاهش مواد در دسترس در طی انبار کاهشیابد(Rodriguez-Gomez et al.,2010).

به طور کلی می‌توان گفت که برای کنترل تخمیر خیارها، استفاده از غلظت نمک ۷٪ کلرید سدیم، اصلاح pH اولیه ملایم با اسیداستیک و تلقیح تعداد زیاد *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* می‌تواند سبب کاهش جمعیت مخمرها و مزوفیل‌های هوازی و در نتیجه تولید محصولی ایمن شود.

## منابع


- Abriouel, H., Benomar, N., Lucas, R. and Galvez, R. (2011).Culture-independent study of the diversity of microbial populations in brines during fermentation of naturally-fermented Alorena green table olives. International Journal of Food Microbiology, 144: 487-496.
- Bautista-Gallego, J., Arroyo-Lopez, F.N., Duran-Quintana, M.C. and Garrido-Fernandez, A. (2010). Fermentation profiles of Manzanilla-Alorena cracked green table olives in different chloride salt mixtures. Food Microbiology, 27: 403-412.
- Caggia, C., Randazzo, C.L., Di Salvo, M., Romeo, F. and Giudici, P. (2004).Occurrence of *Listeria monocytogenes* in green table olives. Journal of Food Protection, 67: 2189-2194.
- Castro, A., Montano, A., Casado, F.J., Sanchez, A.H. and Rejano, L. (2002). Utilization of Enterococcus casseliflavus and Lactobacillus pentosus as starter cultures for Spanish-style green olive fermentation. Food Microbiol, 19: 637-644.
- Chammem, N., Kachouri, M., Mejri, M., Peres, C., Boudabous, A. and Hamdi, M. (2005).Combined effect of alkali pretreatment and sodium chloride addition on the olive fermentation process. Bioresource Technology, 96: 1311-1316.
- Charalampopoulos, D., Pandiella, S.S. and Webb, C. (2003). Evaluation of the effect of malt, wheat and barley extracts on the viability of potentially probiotic lactic acid bacteria under acidic conditions. International Journal of Food Microbiology,82(2): 133-141.
- Charalampopoulos, D. and Pandiella, S.S. (2010). Survival of human derived *Lactobacillus plantarum* in fermented cereal extracts during refrigerated storage. LWT-Food Science and Technology, 43: 431-435.

- Gardner, J.N., Savard, T., Obermeier, P., Caldwell, G. and Champagne, C.P.(2001).Selection and characterization of mixed starter cultures for lactic acid fermentation of carrot, cabbage, beet and onion vegetable mixtures. International Journal of Food Microbiology, 64: 261-275.
- Garrido Fernandez, A., Garcia Garcia, P. and Brenes Balbuena, M. (1995).Olive fermentations.In Rehm, H.J. and Reed, G. (Editors.). Biotechnology: Enzymes, biomass, food and feed. New York, VCH, pp. 593-627.
- Garrido-Fernandez, A., Fernandez Diez, M.J. and Adams, M.R. (1997). Table Olives: Production and Processing. Chapman and Hall, London.
- Kabadjova, P., Dousset, X., Le Cam, V. and Prevost, H. (2002).Differentiation of closely related Carnobacterium food isolates based on 16S-23S ribosomal DNA intergenic spacer region polymorphism. Applied and Environmental Microbiology, 68: 5358-5366.
- Leal-Sanchez, M.V., Ruiz-Barba, J.L., Sanchez, A.H., Rejano, L., Jimenez-Dıaz, R. and Garrido, A. (2003).Fermentation profile and optimization of green olive fermentation using *Lactobacillus plantarum* LPCO10 as a starter culture. Food Microbiology, 20: 421-430.
- Lucke, F.K. (2000). Utilization of microbes to process and preserve meats. Meat Science, 56: 105-115.
- Milesi, M.M., McSweeney, P.L.H. and Hynes, E.R. (2008). Viability and contribution to proteolysis of an adjunct culture of *Lactobacillus plantarum* in two model cheese systems: cheddar cheese-type and soft-cheese type. Journal of Applied Microbiology, 105: 884-892.
- Ozay, G. andBorcakli, M. (1995).Effect of brine replacement and salt concentration on the fermentation of naturally black olives. Food Research International, 28: 553-559.
- Panagou, E.Z, Schillinger, U., Franz, C.M.A.P. and Nychas, G.J.E. (2008). Microbiological and biochemical profile of cv. Conservoleagreen olives processed by the Spanish-method. Food Microbiol, 23: 199-204.
- Paramithiotis, S., Hondrodimou, O.L. and Drosinos, E.H.(2010). Development of the microbial community during spontaneous cauliflower fermentation. Food Research International, 43: 1098-1103.
- Penas, E., Frias, J., Gomez, R. and Vidal-Valverde, C. (2010). High hydrostatic pressure can improve the microbial quality of sauerkraut during storage, Spain. Food Control, 21: 524-528.
- Plengvidhya, V., Breidt Jr., F., Lu, Z. and Fleming, H.P. (2007).DNA fingerprinting of lactic acid bacteria in sauerkraut fermentations. Applied and Environmental Microbiology, 73: 7697-7702.
- Rodriguez-Gomez, F., Arroyo-Lopez, F.N., Lopez-Lopez, A., Bautista-Gallego, J. and Garrido-Fernandez, A. (2010). Lipolytic activity of the yeast species associated with the fermentation/storage phase of ripe olive processing. Food Microbiology, 27: 604-612.
- Romick, T.L. (1994). Biocontrol of *Listeria monocytogenes*, a psychrotrophic pathogen model, in low salt, non-acidified, refrigerated vegetable products. PhD Diss, NC State University.Raleigh, NC.
- Sanchez, I., Palop, L. and Ballesteros, C. (2000). Biochemical characterization of lactic acid bacteria isolated from spontaneous fermentation of 'Almagro' eggplants. International Journal of Food Microbiology, 59: 9-17.
- Singh, A.K. and Ramesh, A. (2008). Succession of dominant and antagonistic lactic acid bacteria in fermented cucumber: Insights from a PCR-based approach. Food Microbiology, 25: 278-287.
- Tamang, J.P., Tamang, B., Schillinger, U., Guigas, C. and Holzapfel, W.H.(2009). Functional properties of lactic acid bacteria isolated from ethnic fermented vegetables of the Himalayas. International Journal of Food Microbiology, 135: 28-33.
- Todorov, S.D. and Dicks,L.M.T. (2005). *Lactobacillus plantarum* isolated from molasses produces bacteriocins active against Gram-negative bacteria. Enzyme and Microbial Technology, 36: 318-326.
- Tsai, C.C., Lai, C.H., Yu, B. and Tsen, H.Y. (2010). Use of PCR primers and probes based on the 23S rRNA and internal transcription spacer (ITS) gene sequence for the detection and enumerization of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus plantarum* in feed supplements. Anaerobe, 16: 270-277.

- Tsapatsaris, S. and Kotzekidou, P. (2004). Application of central composite design and response surface methodology to the fermentation of olive juice by *Lactobacillus plantarum* and *Debaryomyces hansenii*. International Journal of Food Microbiology, 95: 157-168.

# Effect of *Lactobacillus plantarum* on microbial population of Iranian fermented pickle

**Nilchian, Z.[1], Razavi, S.H.[2], Rahimi, E.[3*]**

1- Msc student of Food Science and Technology, School of Agriculture, Shahrekord branch, Islamic Azad University, Shahrekord , Iran.
2- Associate professor of Food Science and Engineering Department, Faculty of Biosystem Engineering, University of Tehran, Tehran, Iran.
3- Associate Professor of Food Sciences and Technology Department, School of Agriculture, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
*Corresponding author email: ebrahimrahimi55@yahoo.com
(Received: 2012/6/9 Accepted: 2013/4/9)

## Abstract

Pickle fermentation is a natural process in which microorganisms could affect the quality of the product. Amongst, *Lactobacillus plantarum* strains that improve the quality of fermented pickle. In this study, in order to produce safe and desirable fermented pickle, local cucumbers were immersed in 5% and 7% (w/v) brine solutions. The samples were inoculated with 0, $4 \times 10^6$, $4 \times 10^7$ and $6 \times 10^8$ cfu/ml of *L. plantarum.* The samples were kept at ambient temperature for 15 days followed by 30 days storage at 4 °C and 25 °C. The bacterial populations were analyzed during the aforementioned stages of fermentation and storage. According to the results, the maximum quantity (8.57 $\log_{10}$ cfu/ml) of *L. plantarum* was observed in the 9 day of fermentation and in the samples inoculated with $6 \times 10^8$ cfu/ml and kept in 5% brine solution. Moreover, compared to the other samples, the population of yeasts and aerobic mesophilic count were the least in the samples inoculated with $6 \times 10^8$ cfu/ml of *L. plantarum* and stored in 7% brine solution. During the storage period, the population of *L. plantarum*, yeasts and aerobic mesophilic in the samples stored at 25 °C were higher than the samples stored at 4 °C. Results revealed that in the 30 day of storage, the highest load (5.47 $\log_{10}$ cfu/ml) of *L. plantarum* was observed in the samples kept in 7% brine solution at 4 °C. It was concluded that providing the condition that favors the appropriate growth of *L. plantarum* could help to hinder the growth of undesirable organisms in fermented pickle.

**Keywords:** *Lactobacillus plantarum*, Microbial population, Fermented pickle.