مجله میکرب شناسی پزشکی ایران
سال ۵ شماره ۷، زمستان ۱۳۹۰ صفحات ۴۱-۳۵

بررسی اثر ضد میکروبی کفیر در زمانهای متفاوت تخمیر

گلنار رحیم زاده[۱] ، دکتر محمد علی بهار[۲]، دکتر نور امیر مظفری[۳]

۱. کارشناسی ارشد میکروبیولوژی گروه زیست شناسی دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات تهران ایران Rahimzadehgolnar@yahoo.com– مجیدیه شمالی شمس آباد بالاتر از میدان ملت کوچه یاس پلاک ۲ واحد ۲- تلفن ۰۹۱۳۲۱۳۳۵۱۱-۰۹۱۹٦٤۰۹۸۷۲ – ۲۲۳۳٦۷۸٦
۲. دانشیار گروه ایمونولوژی دانشگاه عوم پزشکی ایران mobahar@yahoo.com
۳. دانشیار گروه میکروب شناسی دانشگاه عوم پزشکی ایرانamirmozafari@yahoo.com

چکیده :

سابقه وهدف: کفیر یک پروبیوتیک کمپلکس می باشد که مبدأ آن شمال قفقاز است.بطور کلی دانه های کفیر دارای میکروارگانیسم هایی نظیر استرپتوکوکسی های اسید لاکتیک،لاکتوباسیل های مزوفیلیلیک اسید لاکتیک،مخمرهای تخمیر کننده و غیر تخمیر کننده لاکتوز و باکتریهای اسید استیک است، که به اثرات درمانی آنها اشاره شده است.

مواد و روشها: در این مطالعه تجربی اثرات ضد میکروبی کفیر بر روی باکتری سودوموناس آئروژنوزا جدا شده از بیمار دچار سوختگی و سودوموناس آئروژنوزا استاندارد(ATCC 27853) با استفاده از محیطهای کشت میکروبیولوژی و تعیینMIC با استفاده از روش های رقت لوله ای و روش چاهک و بررسی کینیتیک مرگ در حضور دو نوع از عصاره های کفیر در دو زمان متفاوت تخمیر ۹٦ و ۷۲ ساعت در دمای ۳۵ درجه سلسیوس به صورت in vitro مورد مطالعه قرار گرفت. میزان اسید لاکتیک و اسید استیک نیز با HPLC فاز معکوس اندازه گیری گردید.

یافته ها: در این مطالعه تجربی، بیشترین اثر ضد میکروبی عصاره کفیر در دمای ۳۵ درجه سلسیوس با ۹٦ ساعت زمان تخمیر و غلظت ۲۵۰ میلی گرم در میلی لیتر روی سودوموناس آئروژنوزا استاندارد (ATCC 27853) و سودوموناس آئروژنوزا جدا شده از بیمار سوخته بدست آمد.

نتیجه گیری: عصاره کفیر دارای اثرات ضد میکروبی بر روی باکتری سودوموناس آئروژنوزا استاندارد (ATCC 27853) و سودوموناس آئروژنوزا جدا شده از بیمار سوخته می باشد.

واژه های کلیدی: اثرات ضد میکروبی، کفیر، تخمیر

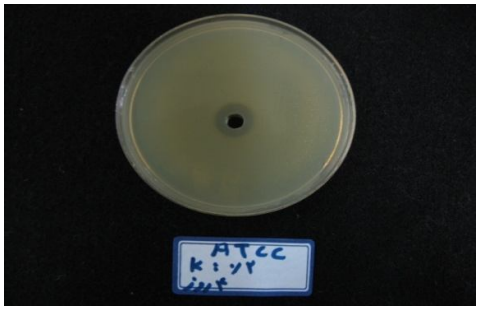
مقدمه:

تاریخچه استفاده از میکروارگانیسم های زنده در غذا به ویژه باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک به منظور حفظ و بهبود سلامت انسان بسیار طولانی است. فرآورده های لبنی اولین نوع از محصولات پروبیوتیکی بوده اند که مورد استفاده بشر قرار گرفته اند. سابقه استفاده از فرآورده های لبنی به ابتدای تمدن بشر بر میگردد و اشاره ای به استفاده از فرآورده های لبنی در انجیل و کتب مقدس هند نیز وجود دارد(۱). پروبیوتیک ها این چنین تعریف می شوند:" میکروارگانیسم های زنده و غیر پاتوژنی که پس از هضم شدن دارای اثرات مثبت بر سلامتی میزبان یا فیزیولوژی او دارند. نهایتاً تعریفی که در سال ۲۰۰۱ توسط کمسیون تخصص از FAO/WHO برای پروبیوتیک ها ارائه شده است عبارت است از " پروبیوتیک ها میکروارگانیسم های زنده ای هستند که وقتی به مقدار کافی از آن ها مصرف می شود اثرات مفیدی بر سلامت انسان دارند (۲).

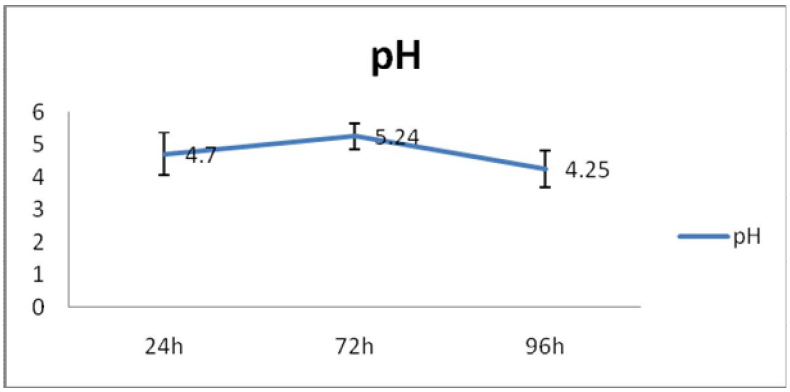
کفیر یک پروبیوتیک کمپلکس و نوعی نوشیدنی است که از تخمیر لاکتیک – الکلی شیر بدست می آید و منشا آن کوههای قفقاز در روسیه می باشد. از اواخر قرن گذشته که تولید کفیر در اروپای شرقی ومرکزی و سایر کشورها انتشار پیدا نمود میکروبیولوژی دانه های کفیر توجه بسیاری از محققان را به خود جلب نمود.در حال حاضر مشخص گردیده است که میکروارگانیسم های موجود در دانه های کفیر شامل باکتری های لاکتیک و باکتری های استیک و مخمرها بوده که بعنوان مایه در تهیه کفیر مورد استفاده قرار می گیرند.باکتری های لاکتیک بطور کلی باسیلها (مزوفیل وترموفیل)و استرپتوکوکهای لاکتیک و لوکونوستوک را شامل می شود(٦-۳). نکته جالب توجه این است که بسیاری از این فرآورده ها در طب سنتی بدون اینکه هیچ اطلاعی از وجود میکروارگانیسم ها و خواص درمانی آن ها وجود داشته باشد به عنوان دارو تجویز می شده اند. ۷٦ سال قبل از میلاد مسیح مورخ رومی استفاده از فرآورده های تخمیری شیر را به منظور درمان گاستروانتریت توصیه نمود(۷). علی رغم پیشرفت ها در زمینه کنترل و درمان زخم های سوختگی و وجود مراقبت های ویژه برای این بیماران، عامل اصلی مرگ و میر در بیماران دچار سوختگی عفونت است(۹-۸) .کنترل عفونت زخم یکی از مشکلات اساسی هر بخش سوختگی است و هر سال تعداد زیادی از بیماران سوخته در اثر این ضایعه جان خود را از دست داده و یا ناتوانی پیدا می کنند. سوختگی نه تنها باعث صدمه شدید پوستی می شود بلکه محیط و شرایط مناسبی را برای رشد و نمو فلور میکروبی و سایر باکتری ها فراهم می آورد(۱۱-۱۰).در اثر سوختگی شدید زخم های عفونی ناشی از باکتری های غیر معمول و یا سپتی سمی تهدید کننده زندگی پدید می آید(۱۳-۱۲). سودوموناس آئروژنوزا معمول ترین عامل عفونت است و بعد از آن به ترتیب استافیلوکوک طلایی ، انتروباکتریاسه و سایر گرم منفی ها و گرم مثبت ها سایر سویه های جدا شده را تشکیل می دهند(۱۵-۱٤). افزایش مقاومت این باکتری ها به آنتی بیوتیک ها مسایل مهم و جدی در درمان و کنترل عفونت را در میان بیماران دچار سوختگی مطرح می کند(۱٦). باکتری سودوموناس آئروژنوزا باسیل گرم منفی است که بوی آمیل الکل ایجاد می کند و کلنی با رنگ فلئورسانت سبز تولید می نماید. این باکتری با توجه به سیستمهای خاص درونی خود از جمله سیستم انتقال مقاومت به آنتی بیوتیک(پلاسمید) به سرعت در مقابل آنتی بیوتیک های مختلف مقاوم شده و باعث انتشار عفونت و سپتی سمی در بدن بیماران خواهد شد. استفاده از وسایل هیدروتراپی و لگن های شستشوی آلوده همگی منابعی هستند که این ارگانیسم از آنها جدا شده است.از جمله راههای مبارزه با عفونتهای ناشی از سودوموناس آئروژینوزا استفاده از آنتی بیوتیکهای مخصوص ضد سودوموناس آئروژینوزا و تعویض مکرر آنها هر ۱ یا ۲ سال است، زیرا این باکتری به سرعت به آنها مقاوم می شود . راه حل دیگر استفاده از آنتی بیوتیک موضعی و برداشتن زودرس زخم و پانسمانهای مکرر می باشد(۱۷). جهت تقویت سیستم ایمنی و جلوگیری از عفونت باکتریایی در سوختگی ترکیبی بنام کفیر مورد توجه می باشد.این ماده نه تنها خاصیت ضد میکروبی داشته بلکه سبب تسریع روند بهبودی و ترمیم زخم سوخته نیز می گردد(۳).

مواد و روش کار:

جهت تهیه عصاره کفیر، دانه های کفیر (۵۰ گرم) بطور متوالی در ۱۰۰ میلی لیتر محیط MRS براث به مدت ٤ روز در شرایط بی هوازی در دمای ۳۵ درجه سلسیوس گرما گزاری شدند. محیط MRS براث در هر ۲٤ ساعت تعوض گردید(۱۸). سپس محلول رویی به مدت ۲۰ دقیقه با سانتریفوز با دور ۱۰۰۰rpm× ٦ سانتریفوژ گردید و محصول رویی با گذراندن از فیلترمیلی پور ۰/۲ میکرون عاری از هر گونه باکتری گشت. **میزان** pH عصاره ها طی زمانهای مختلف تخمیر (۹٦، ۷۲ ساعت) با دستگاه pH سنج دیجیتالی بررسی گردید و در نمودار شماره ۱ نشان داده شده است . جهت بررسی اثرات ضد میکروبی از روش چاهک و رقت لوله ای جهت تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد(MIC) و حداقل غلظت کشنده رشد(MBC) استفاده شد. همچنین کنیتیک مرگ نیز بررسی گردید. درروش چاهک، ابتدا مایه میکروبی که معادل ۰/۵ مک فارلند (۱/۵×۱۰^۸CFU/mL) تهیه گشت، سپس از این مایه میکروبی بصورت متراکم روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد و با پیپت پاستور چاهک به قطر ٦ mm حفر شد و عصاره کفیر حاصله از ۹٦ و ۷۲ ساعت تخمیر در چاهک ریخته شد و سپس پلیتها به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرما گزاری و هاله عدم رشد بعد از ۲٤ ساعت بررسی گردید(۱۸) (شکل ۱).



شکل۱.هاله عدم رشد در روش چاهک در ۹٦ ساعت تخمیر



نمودار ۱- pH عصاره کفیر در دو زمان متفاوت تخمیر(۹٦،۷۲ ساعت)

درروش رقت لوله ای، در ۱۰ عدد لوله استریل درب دار به میزان ده میلی لیتر محیط مولر هینتون براث(M.H.B) ریخته و به لوله اول عصاره کفیر حاصل از دو زمان مختلف تخمیر (۹۶، ۷۲ ساعت) را اضافه کرده سپس یک میلی لیتر از لوله شماره ۱ به لوله شماره ۲ اضافه شد و این عمل تا لوله شماره ۹ تکرار گردید. سپس سوسپانسیون میکروبی شامل باکتری سودوموناس آئروزنوزا سویه استاندارد(ATCC 27853) و نمونه جدا شده از بیمار دچار سوختگی معادل ۰/۵ مک فارلند به مقدار ۱۰۰میکرولیتر به تمام لوله ها اضافه شد و در نهایت لوله ها به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به منظور بررسی MIC و MBC گرما گزاری شدند (۱۸)(جدول ۱). بر اساس روش (Pour plate) کینیتیک مرگ بررسی شد، این روش تا زمان هفت ساعت هر یک ساعت یک بار تکرا شد. در۱۰ عدد لوله استریل درب دار به میزان ۹ میلی لیتر سرم فیزیولوژی ریخته شد و سپس به لوله اول ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری معادل ۰/۵ مک فارلند به لوله اول اضافه شد و از لوله اول ۱ میلی لیتر به لوله دوم اضافه شد و این عمل تا لوله شماره ۹ تکرار گردید. و سوسپانسیون باکتریایی که حاوی عصاره کفیر بود در انکوباتور قرار گرفت و پس از یک ساعت مجددا در ۱۰ عدد لوله این عمل تکرار گردید(۱۸).

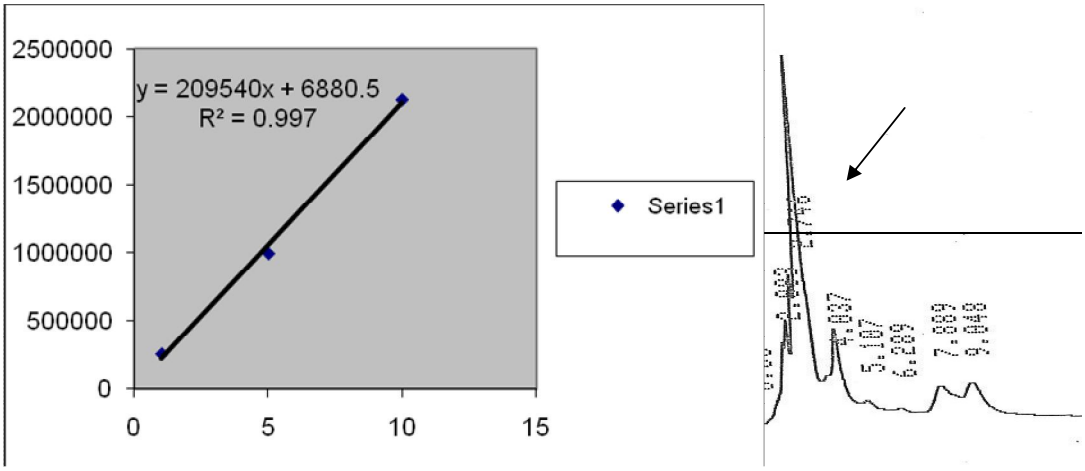
جهت مشخص کردن درصد اسیدهای آلی،از جمله اسید لاکتیک و اسید استیک حاصله از تخمیر کفیر از روش HPLC فاز معکوس با استفاده از ستون C18 استفاده گردید (نمودار۲).

جهت بررسی آماری از نرم افزار Design of experiment وآزمون ANOVA استفاده گردید.

جدول ۱. MIC و MBC عصاره ها ی کفیر در دو زمان ۹٦ و ۷۲ ساعت تخمیر برحسب mg/mL

نوع عصاره کفیر / نوع باکتری	عصاره کفیر حاصل ازتخمیر در دمای ۳۵ درجه سلسیوس با زمان ۹٦ ساعت تخمیر		عصاره کفیر حاصل ازتخمیر در دمای ۳۵ درجه سلسیوس با زمان ۷۲ ساعت تخمیر	
	MIC	MBC	MIC	MBC
سودومو ناس آئروژنوزا استاندارد(ATCC27853)	۲۵۰mg/mL	۲۵۰mg/mL	_____	_____
پسودوموناس آئروژنوزا جدا شده از بیمار دچار سوختگی	۲۵۰mg/mL	۲۵۰mg/mL	_____	_____

علامت (---) بدین معناست که در زمان تخمیر بکار رفته اثر ضد میکروبی دیده نشد.



نمودار۲- HPLC فاز معکوس اسید لاکتیک تولید شده در زمان۹٦ ساعت علامت فلش بیانگر Retention time= 2.74

نتایج:

بررسی اثر ضد میکروبی عصاره کفیر فیلتر شده در روش چاهک بر روی باکتری سودوموناس آئروزنوزا استاندارد(ATCC 27853) و نمونه جدا شده از بیمار دچار سوختگی نشان داد که عصاره کفیر فیلتر شده در دمای ۳۵ درجه سلسیوس در زمان ۷۲ ساعت تخمیر اثر ضد میکروبی بر روی باکتری پسودوموناس آئروزنوزا ندارد و هاله عدم رشد مشاهده نشد. در حالی که عصاره کفیر فیلتر شده در دمای ۳۵ درجه سلسیوس در زمان ۹٦ ساعت تخمیر اثر ضد میکروبی بر روی باکتری پسودوموناس آئروزنوزا داشته و قطر هاله عدم رشد برابر با mm ۱۳ گزارش گردید.

نتایج مربوط به اندازه گیری حداقل غلظت بازدارنده رشد(MIC) و متعاقب آن حداقل غلظت کشنده رشد(MBC) نشان داد که عصاره کفیر فیلتر شده در دمای ۳۵ درجه سلسیوس در زمان ۷۲ ساعت تخمیر اثر ضد میکروبی با غلظت ۲۵۰ میلی گرم در میلی لیتر بر روی باکتری سودوموناس آئروزنوزا نداشت،در حالیکه عصاره کفیر فیلتر شده در دمای ۳۵ درجه سلسیوس در زمان ۹٦ ساعت تخمیر اثر ضد میکروبی با غلظت ۲۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر بر روی باکتری سودوموناس آئروزنوزا داشت بطوری که حداقل غلظت بازدارنده رشد(MIC) برابر ۲۵۰ میلی گرم در میلی لیتر بود (جدول ۱).

در بررسی کینتیک مرگ با توجه به اینکه غلظت باکتری در ساعت صفر ($۱۰^{٦}$ CFU/mL) بود، با گذشت هر یک ساعت از زمان میزان باکتری سودوموناس آئروژنوزا (Log ۱) کاهش داشت و مشخص گردید که عصاره کفیر حاصل از تخمیر ۹٦ ساعت در دمای ۳۵ درجه سلسیوس تاثیر باکتریوسید بر باکتری سودوموناس آئروژنوزا داشته است.

در روش HPLC فاز معکوس میزان اسید لاکتیک حاصله از تخمیر کفیر در دمای ۳۵ درجه سلسیوس طی زمان ۹٦ ساعت ۸٤.۱٤ درصد و اسید لاکتیک حاصله از تخمیر کفیر در دمای ۳۵ درجه سلسیوس طی زمان ۷۲ ساعت ۵۳.٦۱ درصد محاسبه گردید. میزان اسید استیک تولید شده طی تخمیر کفیر در دمای ۳۵ درجه سلسیوس طی زمان ۹٦ ساعت، ۱۷.۷٦ درصد محاسبه گردید،در صورتی که اسید استیک در دمای ۳۵ درجه سلسیوس طی زمان ۷۲ ساعت تولید نشده بود. از نظر آماری با توجه به

اینکه($p\leq 0/0001$) محاسبه گردید، کلیه نتایج دارای اختلاف بسیار معنی داری بودند.

بحث:

استارتر کفیر با فرض بر اینکه دما ثابت باشد ، در زمانهای مختلف تخمیر محصولات متفاوتی تولید می نماید. بطوری که طبق نمودار ۱ طی تخمیر کفیر در دمای ۳۵ درجه سلسیوس در زمان ۹٦ ساعت اسید بیشتری تولید شده و کاهش pH دیده شد.در نتیجه افزایش اسیدیته حاصل در طی فرآیند تخمیر کفیر سبب افزایش اثرات ضد میکروبی عصاره کفیر شد. طی فرآیند تخمیر کفیر در دمای ۳۵ درجه سلسیوس با زمان ۷۲ ساعت تخمیر، pH افزایش می یابد که در روش چاهک هاله عدم رشد مشاهده نگردید. در این زمان برای عصاره کفیر MIC,MBC تعریف نشد که در نهایت کاهش اثر ضد میکروبی عصاره کفیر پس از ۷۲ ساعت تخمیر نتیجه می گردد. در شرایط تخمیر کفیر با دمای ۳۵ درجه سلسیوس و زمان ۹٦ ساعت، MBC = MIC بوده و میزان آن ۲۵۰ میلی گرم در میلی لیتر می باشد،در این زمان عصاره کفیر اثر ضد میکروبی داشته که علت آن افزایش اسیدیته و حضور اسیدهای آلی ازجمله اسید لاکتیک و اسید استیک است که سبب افزایش اثرات ضد میکروبی آن شده است. در طی تخمیر در زمانهای ۷۲ و ۹٦ ساعت، اسید لاکتیک تولید گردیده و طبق نمودار ۲ حاصل از روش HPLC فاز معکوس درصد اسید لاکتیک تولید شده در زمان ۹٦ ساعت بیشتر از زمان ۷۲ ساعت بوده که این خود دلیلی بر اثر ضد میکروبی عصاره کفیر در زمان ۹٦ ساعت می باشد. درصد اسید استیک نیز با روش HPLC در دو زمان ۷۲ و ۹٦ ساعت اندازه گیری شد. در زمان ۷۲ ساعت تخمیر، اسید استیک تولید نشد در صورتی که در زمان ۹٦ ساعت تخمیر، اسید استیک نیز تولید گردیده است. در دو زمان تخمیر، اسید لاکتیک تولید گردید ولی اثر ضد میکروبی عصاره کفیر در زمان ۹٦ ساعت بیشتر بود که به دلیل اسیداستیک تولید شده در این زمان می باشد و بیانگر این است که اثر ضد میکروبی اسیداستیک بیشتر از اسید لاکتیک می باشد. کفیر ۲٤ ساعته ۰/۲درصد ، ٤۸ ساعته ۰/٤درصد، ۷۲ ساعته ۰/٦درصد الکل اتیلیک داشت. با آزمایشات انجام شده توسط Webb در سال ۱۹۷۰ مشخص شد که اسید بیشتر و CO2 بیشتر در دمای پایین تر حاصل می گردد.از طرفی افزایش دما و زمان تخمیر قوام و ویسکوزیته ماست های حاصله را افزایش می دهد.تحقیقات دیگری با استارترهای مختلف در تهیه عصاره کفیر بکار رفته و مشخص شد که باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم ایجاد ماده ضد میکروبی لاکتین کرده و در جهت کنترل رشد اشرشیاکلی و مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و باسیلوس سوبتیلیس بکار می رود (۱۹). طبق آزمایشات Evenshtein در سال ۱۹۷۸ نشان داده شد با مصرف کفیر در محیط معدی – روده ای ، غلظت کل اسید معدی افزایش می یابد و اثرات ضد میکروبی بیشتری بر روی میکروارگانیسم های بیماریزا دارد و چنانچه بجای شیره معدی ، سرم فیزیولوژی بکار رود این اثر کم می شود(۱۹). لذا با توجه به نتایج به دست آمده در این مطا لعه می توان از خاصیت ضد میکروبی عصاره کفیر جهت از بین بردن میکروبهای بیماریزا استفاده کرد.

فهرست و منابع :

1- Rodas D.E. Hypocholesterolemic action of Lactobacillus acidophilus ATTC 43121 and calcium in swine with hypercholesterolemia induced by diet. Journal of Dairy Science.erwM.1986, 79: 2121-2128.

2- Fuller R. Probiotics in man and animals; A review. J. Appl. Bacteriol. (1989), 66: 365-378.

3- Rodrigues K.L.,Rita L, Caputo G, Tavares J. C., Evangelista J. Antimicrobial and healing activity of kefir and kefiran extract, 2005: 404-408.

4- karoline R, Sheila A, Rodrigues L. X. F., Alvaro S. Antimicrobial activity of broth fermented with kefir grains, 2009: 316-352.
5- Santos A , Mauro M.S, Sanchez A, Torres J.M and Marquin D. The antimicrobial properties of different strains of Lactobacillus spp. lsolated from kefir, 2003: 434-437.
6- Atalan G, Clhan M, Demirkan I, Onder F, Yaman H. Mahmuut Sozmen. Effect of topical kefir application on open wound healing an invivo study, 2005: 43-47.
7- Fooks L.J., Gibson G.R. (2002) Probiotic as modulators of the gut flora. Br. J. Nutr. 88: 539-549.
8- Howard P.A, Cancio L.C, Mcmanus A.T. What New in burn associated infections? Curr surg 1999;56:397-405.
9- Ravathi G, Puri J, Jain B.K. Bacteriology of burns.Burns1998;24(4):347-249.
10- Murray P.R, Rosenthal K.S, Kobayashi G.S, Pfaller M.A. Medical Microbiology . 4th.ed.Philadelphia:Mosby,2002;pp:78-81.
11- Still J, Law E, Friedman B, Fuhrman S, Newton T. Vancomycin-resistant organisms on a burn unit. South Med J,2001;94(8):810-2.
12- Bang R.L,Gang R.K,Sanyal S.C, Mokaddas E, Ebrahim M.K. Burn Septicemia: an analysis of 79 patients Burn ,1998;24:354-361.
13- Blot S.I, Hoste E.A. Staphylococcal septicemia in burns.Burns,2001;27(2):203.
14- Mcmanus A.T, Mason A.D, Mcmanus J.R,WF etal. Twenty- five years review of pseudomonas aeruginosa bacteremia in a burn center.Eur J Clin Microbial ,1985;4: 219-33.
15- Song W, Lee K.M, Kang H.J, Shin D.H, Kim D.K. Microbiologic aspects of predominant bacteria isolated from the burn patients in Korea.Burns,2001;27(2):136-9.
16- Li J, Zeng H, Xu X. A. study of methicillin resistant *staphylococcus aureus*(MRSA) in a burn unit with repetitive-DNA-sequence-based PCR fingerprinting. Zhonghua Shao Shang Za Zhi,2001;17(2):88-90.
17- Tredget E, Shankowsky H.A, Joffe A.M, Dobke M, Mcdonald J.C. Epidemiology of infections with *pseudomonas aeroginosa* in burn patients: the role of hydrotherapy. Clin infect Dis 1992;15(6):941-949.
18-Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test: approved standard M2-A6. 6th ed. Wayne, PA: National Committeefor Clinical Laboratory Standards (NCCLS); 2002.
19- Evenshtein E. Use of Keffir for stimulation of gastric secretion, prob1 uberk1978;2:824.