نشریه میکروبیولوژی دامپزشکی
دوره نوزدهم، شماره اول، بهار و تابستان ۱۴۰۲،
پیاپی ۴۶: ۱۲۱-۱۰۲

JVM Journal of Veterinary Microbiology

مقاله کاربردی

بررسی فعالیت ضدباکتریایی نمونه‌های کفیر تهیه شده با شیر گاو، گاومیش، گوسفند و بز علیه تعدادی از باکتری‌های بیماری‌زا

عرازسلطان ساعدی فر[۱]، هادی کوهساری*[۲]، مریم صادق شش‌پلی[۳]

۱- کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، واحد مینودشت، دانشگاه آزاد اسلامی، مینودشت، ایران

۲- دانشیار، گروه میکروبیولوژی، واحد آزادشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، آزادشهر، ایران

۳- دکتری تخصصی پزشکی مولکولی، واحد گرگان، دانشگاه آزاد اسلامی، گرگان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۵/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۴ /۱۴۰۲/۰۹

چکیده

کفیر یک پروبیوتیک کمپلکس، از یک مجموعه همزیستی میکروبی است که از تخمیر شیر به‌وسیله دانه‌های کفیر حاصل می‌شود. نوع سوبسترا (شیر) مورد استفاده برای تهیه این نوشیدنی تخمیری در فعالیتهای بیولوژیک آن از جمله فعالیت ضدباکتریایی تاثیر دارد. هدف از مطالعه حاضر بررسی فعالیت ضدباکتریایی نمونه‌های کفیر تهیه شده با شیر گاو، گاومیش، گوسفند و بز است. دانه‌های کفیر فعال شده به شیر گاو (پرچرب و کم چرب)، گاومیش، گوسفند و بز افزوده شدند و عمل تخمیر در دماهای ۲۵ و ۳۷ درجه سانتیگراد انجام شد. پس از انجام فرایند تخمیر، دانه‌های کفیر از عصاره کفیر جدا شدند و فعالیت ضدباکتریایی عصاره علیه ۱۰ باکتری بیماریزا، بر اساس انتشار در آگار و با روش چاهک مورد ارزیابی قرار گرفت. نوع شیر دام مورد استفاده در تهیه نمونه‌های کفیر در دمای ۲۵ و ۳۷ درجه سانتیگراد تاثیر معناداری بر فعالیت ضدباکتریایی علیه باکتریهای مورد آزمون به استثناء *سالمونلا تیفی موریوم* داشت ($P<۰/۰۵$). نمونه‌های کفیر تهیه شده در ۳۷ درجه سانتیگراد در مقایسه با ۲۵ درجه سانتیگراد فعالیت ضدباکتریایی بیشتری نشان دادند. بیشترین فعالیت ضدباکتریایی علیه *سودوموناس آئروژینوزا*، *انتروکوکوس فکالیس*، ایزوله بومی *کلبسیلا پنومونیه* و *باسیلوس سرئوس* در نمونه‌های تهیه شده با شیر گاومیش و در دمای تخمیر ۳۷ درجه سانتیگراد به ترتیب با میانگین قطر هاله عدم رشد ۲۲، ۲۴/۵، ۲۰ و ۱۸ میلیمتر مشاهده شد. بیشترین فعالیت ضدباکتریایی علیه *شیگلا دیسانتری*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سالمونلا تیفی موریوم* به نمونه‌های کفیر تهیه شده با شیر بز و در دمای تخمیر ۳۷ درجه سانتیگراد مربوط می‌شود. بیشترین فعالیت ضدباکتریایی علیه سویه استاندارد *اشریشیا کلی*، *باسیلوس سرئوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* در نمونه‌های تهیه شده با شیر گوسفند و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد مشاهده شد. حساس‌ترین باکتریهای مورد مطالعه به نمونه‌های تهیه شده با شیر گاو پرچرب، ایزوله بومی *اشریشیا کلی* و سویه استاندارد *کلبسیلا پنومونیه* بودند. در نتیجه گیری نهایی باتوجه به فعالیت ضدباکتریایی نمونه‌های کفیر تهیه شده با شیر گاومیش، بز و گوسفند، استفاده از شیر این دامها به‌عنوان سوبسترای مناسب و جایگزین شیر گاو برای تهیه این نوشیدنی تخمیری توصیه می‌شود. همچنین انجام فرایند تخمیر در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد برای دستیابی به فعالیت ضدباکتریایی بیشتر پیشنهاد می‌شود.

واژه های کلیدی: کفیر، فعالیت ضد باکتریایی، شیر گاو، شیر گاومیش، شیر گوسفند، شیر بز

*نویسنده مسئول: هادی کوهساری

آدرس: گروه میکروبیولوژی، واحد آزاد شهر، دانشگاه ازاد اسلامی، آزاد شهر، ایران

پست الکترونیکی: hadikoohsari@yahoo.com

مقدمه

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که وقتی به مقدار کافی از آن ها مصرف می شود اثرات مفیدی بر سلامت انسان دارد (Fuller, 1989). فرآورده‌های لبنی اولین نوع از محصولات پروبیوتیکی بوده‌اند که مورد استفاده بشر قرار گرفته‌اند. کفیر مثالی از یک پروبیوتیک است که انواع مختلفی از باکتری ها و مخمرها در آن حضور دارند (Simova *et al.*, 2002). نوشیدنی کفیر از جمله قدیمی‌ترین محصولات تخمیری شیر است که یک پروبیوتیک طبیعی و نوشابه‌ای الکلی – لاکتیکی است که از تخمیر شیر به وسیله دانه‌های کفیر حاصل می شود. مصرف کفیر در ارتقای سلامت مؤثر است و سبب بالا بردن سیستم ایمنی بدن، متعادل کردن فشار خون، درمان بیماری‌های گوارشی و کاهش سطح کلسترول سرم می‌شود و همچنین دارای فعالیت های ضد باکتریایی، ضدقارچی و ضدتوموری می باشد (Farnworth, 2006).

دانه‌های کفیر، دانه‌های ژله مانندی شبیه گل‌های گل‌کلم کوچک هستند. طول آنها ۱ تا ۳ سانتی متر، دارای لبه و شکل نامنظم و به رنگ سفید تا زرد و دارای یک بافت لزج اما محکم هستند (Fuller, 1989; Farnworth, 2006). دانه‌های کفیر وقتی به شیر تازه منتقل می شوند، زنده می مانند و در این مدت تقریباً ۲۰ ساعت رشد می کنند و جرم آنها ۲۵ درصد افزایش می یابد (Farnworth, 2006). ظرفیت تولید مثلی دانه های کفیر به طور قابل توجهی تحت تاثیر شرایط رشد قرار دارد. در شرایط نامساعد، رشد دانه کفیر مختل می‌شود، ظاهر آنها بدتر می‌شود و انعطاف پذیری آنها از دست می‌رود، کوچک می‌شوند و تعادل میکروبیولوژیکی آنها مختل می‌شود. در حالی که در شرایط مساعد، پس از پاساژهای متعدد در شیر، ظاهر معمولی، عملکردهای فیزیولوژیکی و خصوصیات تکنولوژیکی خود را بازیابی می کنند (Pop *et al.*, 2014).

میکرو فلور دانه‌های کفیر بسته به منبع دانه متغیر است. دانه‌ها، حاوی گروهی از میکروب‌های خاص هستند که در یک رابطه پیچیده همزیستی وجود دارند و شامل گونه‌های مخمرها، باکتری‌های اسیدلاکتیک (لاکتوباسیلوس و لاکتوکوکوس) و باکتری‌های اسید استیک هستند (Garbers *et al.*, 2004).

باکتری‌های اسیدلاکتیک موجود در دانه‌های کفیر به دلیل توانایی رقابت و مهار رشد میکروارگانیسم‌های بیماریزا و عامل فساد، چه با تولید اسیدلاکتیک و چه با افزایش بیان ترکیبات ضدمیکروبی، توجه قابل توجهی را به خود جلب کرده‌اند (Kourkoutas *et al.*, 2007). طیف وسیعی از ترکیبات فعال زیستی از جمله اسیدهای آلی، CO_2، پراکسیدهیدروژن، اتانول، پپتیدهای فعال زیستی، اگزوپلی‌ساکاریدهایی مانند کفیران، باکتریوسین ها از تخمیر دانه های کفیر تولید می شوند که به طور مستقل یا با یکدیگر مزایای سلامتی مختلفی مرتبط با مصرف کفیر را باعث می شوند. محصولات اصلی تخمیر کفیر، اسید لاکتیک، اتانول، و CO_2 هستند که ویسکوزیته، اسیدیته و مقدار کم الکل این نوشیدنی را مهیا می‌کنند. اجزای جزئی از جمله دی‌استیل، استالدهید، اتیل و اسیدهای آمینه نیز به طعم این نوشیدنی تخمیری کمک می کنند (Rattray and O'Connell, 2011).

ترکیب شیمیایی کفیر نه تنها به دانه های کفیر، بلکه به منشا جغرافیایی دانه ها، دما و شرایط تخمیر مربوط به زمان و به ویژه به نوع و حجم شیر مصرفی بستگی دارد (İrkin and Berkacan, 2022).

تکثیر میکروارگانیسم‌های موجود در دانه‌های کفیر و تولید متابولیت‌های ثانویه مختلف توسط این

میکروارگانیسم‌ها با توجه به نوع شیر متفاوت است که در نهایت بر روی نوشیدنی کفیر با توجه به ویژگی‌های تغذیه‌ای و سلامت انسان تأثیر می‌گذارد (Guzel-Seydim *et al.*, 2011; Khan *et al.*, 2020).

ترکیب شیمیایی، محتویات معدنی و ویتامین‌های شیر بدست آمده از حیوانات مختلف به دلیل چندین عامل مهم بسیار متفاوت است و به دلیل تفاوت در ترکیبات شیمیایی شیرهای مختلف، تفاوت‌هایی در کیفیت و ویژگی های مرتبط با سلامت محصولات وجود دارد (Morand-Fehr *et al.*, 2007). به همین دلایل نوع سوبسترا (شیر) مورد استفاده در فرایند تخمیر به وسیله دانه‌های کفیر در فعالیتهای بیولوژیک این نوشیدنی از جمله فعالیتهای ضدباکتریایی آن نقش بسزایی دارد. معمولا از شیر گاو برای تهیه این نوشیدنی تخمیری استفاده میشود و مطالعات زیادی هم در این خصوص انجام شده است. با این وجود استفاده از شیر دامهای مختلف برای تهیه این نوشیدنی و بررسی فعالیت‌های ضدباکتریایی این نوشیدنی‌های تخمیری می تواند زمینه های مبهم بسیاری در خصوص تهیه نوشیدنی کفیر با شیر دامهای مختلف را شفاف سازد. در مطالعه حاضر نمونه‌های کفیر علاوه بر شیر گاو، با استفاده از شیر دامهای دیگر یعنی بز، گوسفند و گاو میش تهیه شدند و فعالیت ضدباکتریایی این نوشیدنی‌های تخمیری تهیه علیه ۱۰ باکتری بیماریزا شامل *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس*، *شیگلا دیسانتری*، *انتروکوکوس فکالیس*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *سالمونلا تیفی موریوم*، *اشریشیا کلی* (ایزوله بومی و سویه استاندارد) و *کلبسیلا پنومونیه* (ایزوله بومی و سویه استاندارد)، مورد بررسی قرار گرفت. همچنین ویژگی‌های حسی نمونه‌های کفیر تهیه شده نیز مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

تهیه نمونه های کفیر و آماده سازی عصاره های آنها

دانه های کفیر از فروشگاه پربیوتیک تهیه شد و فرایند احیاء و تخمیر دانه مطابق روش ارائه شده توسط Ajam and Koohsari (۲۰۲۰) انجام شد. بطور خلاصه دانه ها با ساب کالچرهای متوالی در شیر به مدت ۴ روز در ۲۵ درجه سانتیگراد احیاء شدند. شیر هر ۲۴ ساعت تعویض گردید. پس از احیاء، دانه های کفیر با آب مقطر استریل شسته شدند و ۵ گرم از آن‌ها به ۵۰ میلی لیتر شیر گاو (پرچرب و کم چرب) و همچنین شیر گاومیش، گوسفند و بز تلقیح شد و در دماهای ۲۵ و ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شدند. پس از بازه زمانی تخمیر (۴۸ساعت) دانه های کفیر از محصول تخمیری جدا شدند. عصاره‌های کفیر تا زمان انجام آزمون‌های فعالیت ضدباکتریایی در دمای یخچال نگهداری شدند (Ajam and Koohsari, 2020).

آماده سازی سویه های باکتریایی مورد آزمون

فعالیت ضدباکتریایی عصاره های کفیر علیه ۱۰ باکتری بیماریزا مورد بررسی قرار گرفت. باکتری‌های بیماریزا شامل ۷ باکتری گرم منفی یعنی *اشریشیا کلی* (ایزوله بومی و سویه استاندارد PTCC 1338)، *شیگلا دیسانتری* (PTCC 1188) ، *سالمونلا تیفی موریوم* (PTCC 1596)، *سودوموناس آئروژینوزا* (PTCC 1811) و *کلبسیلا پنومونیه* (ایزوله بومی و سویه استاندارد PTCC 1290) و سه باکتری گرم مثبت شامل *استافیلوکوکوس اورئوس* (PTCC 1112)، *باسیلوس سرئوس* (PTCC 1154) و *انتروکوکوس فکالیس* (PTCC 1778) بودند. سویه‌های استاندارد به صورت لیوفیلیزه از سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران تهیه شدند و در آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد

اسلامی واحد گنبدکاووس در محیط BHI و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد احیاء شدند. آنگاه چند کلنی یک دست از کشت ۲۴ ساعته هر باکتری به محیط کشت نوترینت براث تلقیح شد و در ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه‌گذاری شد تا کدورتی معادل ۰/۵ مک فارلند $۱/۵\times۱۰^{۸}$ CFU/ml حاصل شود (Weinstein *et al.*, 2018).

بررسی اثرات ضد باکتریایی به روش چاهک

فعالیت ضدباکتریایی عصاره های کفیر، بر اساس انتشار در آگار و با روش چاهک مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین منظور از سوسپانسیون معادل نیم مک فارلند ($۱/۵ \times ۱۰^{۸}$CFU/ml) باکتریهای بیماریزای مورد آزمون با سواپ استریل در سطح محیط کشت مولر هینتون آگار کشت یکنواخت تهیه شد. سپس با کمک چوب پنبه سوراخ کن استریل چاهک هایی به قطر ۸ میلی متر در محیط حفر شد و ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره های کفیر در داخل چاهک‌ها ریخته و به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شد. پس از این مدت با اندازه گیری قطر هاله عدم رشد در اطراف چاهک‌ها حساسیت یا مقاومت باکتری‌های مورد آزمون تعیین شد (Weinstein *et al.*, 2018).

ارزیابی حسی

ارزیابی حسی نمونه های کفیر تهیه شده توسط ۱۰ نفر از داوران از افراد داوطلب از نظر ویژگی‌های حسی شامل آزمون‌های ظاهرکلی، رنگ، عطر وبو، طعم و احساس دهانی (بافتی) مورد ارزیابی قرار گرفت. اعضای پانل معیار خود از ارزیابی حسی نمونه‌های کفیر تهیه شده با استفاده از یک مقیاس حسی ۹ نمره‌ای مشخص نمودند. در این مقیاس نمره ۹ خیلی عالی، نمره ۸ عالی، نمره ۷ خوب، نمره ۶ نسبتا خوب، نمره ۵ نه خوب و نه بد، نمره ۴ نسبتا بد نمره ۳ بد، نمره ۲ خیلی بد و نهایتا نمره ۱ فوق العاده بد لحاظ گردید (Meilgaard *et al.*, 1991).

تجزیه و تحلیل آماری

متغیرهای مستقل تحقیق شامل نوع کفیر (نمونه‌های کفیر تهیه شده از شیر گاو پرچرب و کم چرب و نمونه‌های کفیر تهیه شده با شیر گاومیش، شیر گوسفند و شیر بز)، دمای تخمیر (۲۵ و۳۷ درجه سانتیگراد) و نوع باکتری بیماری‌زا (۱۰ گونه باکتری) و متغیرهای وابسته تحقیق فعالیت ضدباکتریایی (قطر هاله عدم رشد هر یک از باکتریهای بیماری‌زا در مواجه با نمونه‌های کفیر) و ویژگی‌های حسی نمونه‌های کفیر تهیه شده می‌باشند. هر آزمون حداقل در سه تکرار انجام شد و داده‌های حاصل بر اساس طرح کاملا تصادفی و به کمک ANOVA یا آنالیز واریانس مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. مقایسه میانگین‌ها اعم از نتایج آزمون‌های ضدباکتریایی (قطرهای هاله عدم رشد) و نتایج ویژگی‌های حسی با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح معنی داری $P<0.05$ صورت گرفت و تجزیه تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS 18 و رسم نمودارها با نرم افزار Excel صورت پذیرفت.

نتایج

نتایج میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری‌های بیماری‌زای مورد آزمون در مواجهه با نمونه‌های کفیر تهیه شده با شیر دام‌های مختلف در دمای ۲۵ و ۳۷ درجه سانتیگراد در جدول ۱ و شکل ۱ نشان داده شده است. نتایج نشان داد، نوع شیر دام مورد استفاده در تهیه نمونه‌های کفیر در دمای ۲۵ و ۳۷ درجه سانتیگراد تاثیر معناداری بر فعالیت ضدباکتریایی علیه همه باکتری‌های مورد آزمون به استثناء *سالمونلا تیفی‌موریوم* داشت ($P<۰/۰۵$) جدول ۱).

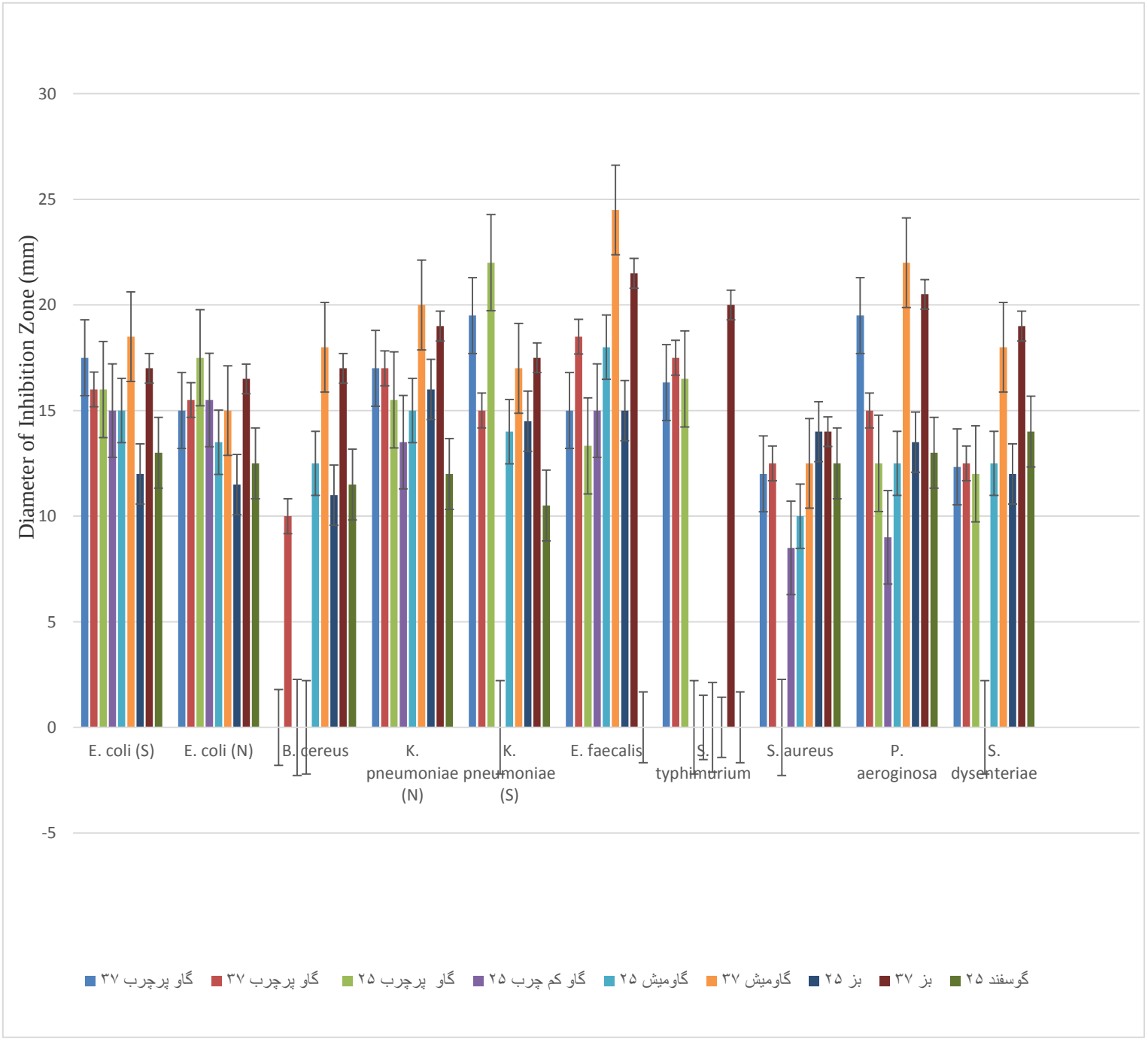
جدول ۱. میانگین قطر هاله عدم رشد باکتریهای مورد آزمون در نمونه های کفیر تهیه شده با شیر گاو، گاومیش، بز و گوسفند

	گاو پرچرب ❋۳۷	گاو کم‌چرب ۳۷	گاو پرچرب ۲۵	گاو کم چرب ۲۵	گاومیش ۲۵	گاومیش ۳۷	بز ۲۵	بز ۳۷	گوسفند ۲۵	گوسفند ۳۷	سطح معنی داری
اشریشیا کلی (سویه استاندارد)	۱۷/۵±۰/۵^{abBC}	۱۶±۰^{abDE}	۱۶±۰^{bcDE}	۱۵±۰^{aE}	۱۵±۰^{bE}	۱۸/۵±۰/۵^{cdAB}	۱۲±۰^{cdF}	۱۷±۱^{cdCD}	۱۳±۰^{abF}	۱۹/۵±۰/۵^{aA}	۰/۰۰
اشریشیا کلی (ایزوله بومی)	۱۵±۱^{bcBCD}	۱۵/۵±۰/۵^{bcBC}	۱۷/۵±۰/۵^{bA}	۱۵/۵±۰/۵^{aBC}	۱۳/۵±۰/۵^{bcDE}	۱۵±۰^{eBCD}	۱۱/۵±۰/۵^{dF}	۱۶/۵±۰/۵^{dAB}	۱۲/۵±۰/۵^{abE} F	۱۴/۵±۰/۵^{cCD}	۰/۰۰
باسیلوس سرئوس	–	۱۰±۰^{dE}	-	-	۱۲/۵±۰/۵^{cC}	۱۸±۰^{cdA}	۱۱±۰^{dD}	۱۷±۰^{cdB}	۱۱/۵±۰/۵^{bcD}	۱۸±۰^{abA}	۰/۰۰
کلبسیلا پنومونیه (ایزوله بومی)	۱۷±۱^{abBC}	۱۷±۱^{abBC}	۱۵/۵±۰/۵^{cCD}	۱۳/۵±۰/۵^{aDE}	۱۵±۱^{bCD}	۲۰±۰^{bcA}	۱۶±۱^{aCD}	۱۹±۱^{bcAB}	۱۲±۰^{bcE}	۱۴/۵±۰/۵^{cCD}	۰/۰۰
کلبسیلا پنومونیه (سویه استاندارد)	۱۹/۵±۰/۵^{aB}	۱۵±۱^{bcDE}	۲۲±۱^{aA}	-	۱۴±۱^{bcE}	۱۷±۰^{deCD}	۱۴/۵±۰/۵^{abE}	۱۷/۵±۰/۵^{cdBC}	۱۰/۵±۰/۵^{cF}	۱۷/۵±۰/۵^{abBC}	۰/۰۰
انتروکوکوس فکالیس	۱۵±۱^{bcD}	۱۸/۵±۱/۵^{aC}	۱۳/۳۳±۰/۳۳^{dD}	۱۵±۱^{aD}	۱۸±۱^{aC}	۲۴/۵±۰/۵^{aA}	۱۵±۰^{abD}	۲۱/۵±۰/۵^{aB}	–	–	۰/۰۰
سالمونلا تیفی موریوم	۱۶/۳۳±۳/۲۱^{abA}	۱۷/۵±۰/۵^{abA}	۱۶/۵±۰/۵^{bcA}	–	-	-	-	۲۰±۰^{abA}	–	۱۸/۵±۰/۵^{abA}	**۰/۳٤**
استافیلوکوکوس اورئوس	۱۲±۰/۵۷^{cAB}	۱۲/۵±۰/۵^{cdA}	–	۸/۵±۰/۵^{bC}	۱۰±۰^{dBC}	۱۲/۵±۰/۵^{fA}	۱۴±۱^{bA}	۱۴±۱^{eA}	۱۲/۵±۰/۵^{abA}	۱۴±۱^{cA}	۰/۰۰
سودوموناس آئروژینوزا	۱۹/۵±۱/۵^{aAB}	۱۵±۱^{bcCD}	۱۲/۵±۰/۵^{dD}	۹±۰^{bE}	۱۲/۵±۰/۵^{cD}	۲۲± ۲^{bA}	۱۳/۵±۰/۵^{bcC} D	۲۰/۵±۰/۵^{abA}	۱۳± ۰/۵^{abCD}	۱۶/۵±۱/۵^{bcBC}	۰/۰۰
شیگلا دیسانتری	۱۲/۳۳±۰/۳۳^{cC}	۱۲/۵±۰/۵^{cdC}	۱۲±۰^{dC}	-	۱۲/۵±۰/۵^{cC}	۱۸±۰^{cdA}	۱۲±۰^{cdC}	۱۹±۱^{bcA}	۱۴±۱^{aC}	۱۶±۱^{bcB}	۰/۰۰
سطح معنی داری	۰/۰۳	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۲	۰/۰۰	

❋ درجه سانتیگراد

میانگین±انحراف معیار. حروف مشترک کوچک در هر ستون بیانگر عدم وجود اختلاف معنی دار در بین تیمارها می‌باشد ($P\geq$۰/۰۵).

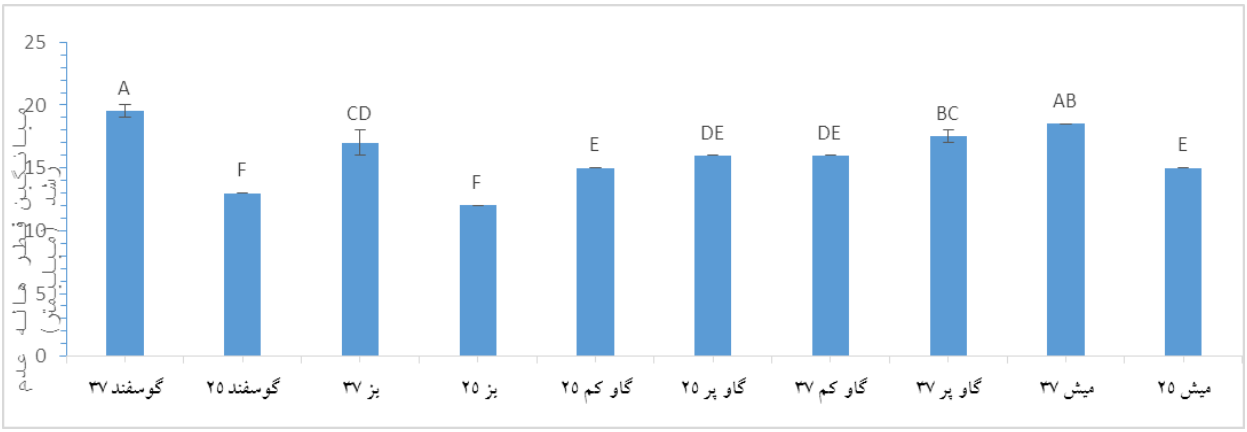
میانگین±انحراف معیار. حروف مشترک بزرگ در هر ردیف بیانگر عدم وجود اختلاف معنی دار در بین تیمارها می‌باشد ($P\geq$۰/۰۵).



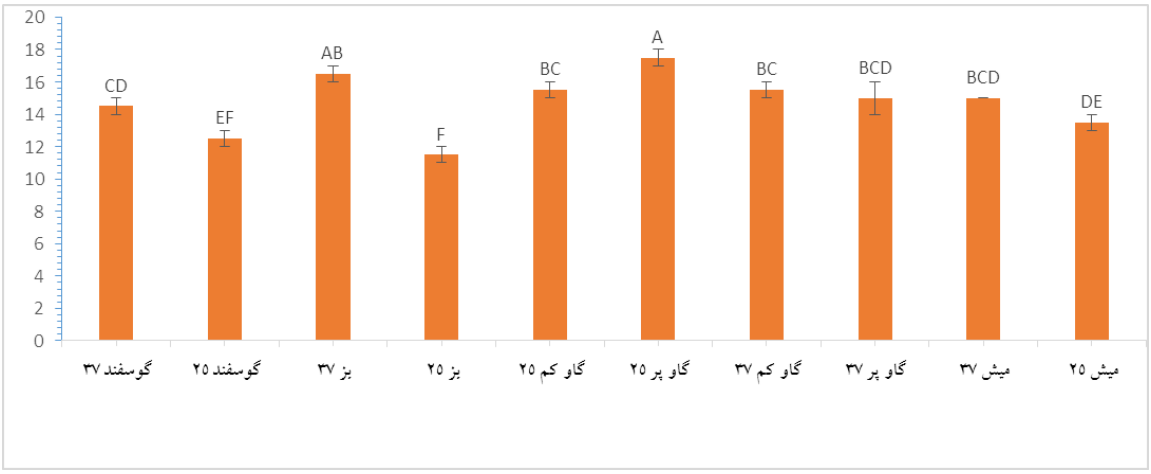
شکل ۱. میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری‌های مورد آزمون در نمونه های کفیر تهیه شده با شیر گاو، گاومیش، بز و گوسفند

تاثیر انواع نمونه‌های کفیر تهیه شده با شیر گاو، گاومیش، گوسفند و بز در دمای تخمیر ۲۵ و ۳۷ درجه سانتیگراد بر هر یک از ۱۰ گونه باکتری بیماری‌زای مورد آزمون

نتایج مربوط به سویه استاندارد و ایزوله بومی *اشریشیا کلی* حاکی از وجود اختلاف معنی دار در بین تیمارها می باشد (P<۰/۰۵) (شکل ۲و۳)، بطوریکه بر اساس مقایسه دانکن، بیشترین فعالیت ضدباکتریایی بطور معنی‌دار به ترتیب در تیمار کفیر تهیه شده با شیر گوسفند، گاومیش و شیر گاو پرچرب همگی در ۳۷ درجه سانتیگراد به ترتیب با میانگین قطر هاله عدم رشد ۱۹/۵، ۱۸/۵ و ۱۷/۵ میلیمتر برای سویه استاندارد این باکتری بود (جدول ۱) و بطور کلی نتایج حاصل بخصوص در سویه استاندارد دلالت بر تفاوت معنی دار قطر هاله عدم رشد در تیمارهای کفیر در دمای ۳۷ درجه داشت (P<۰/۰۵).

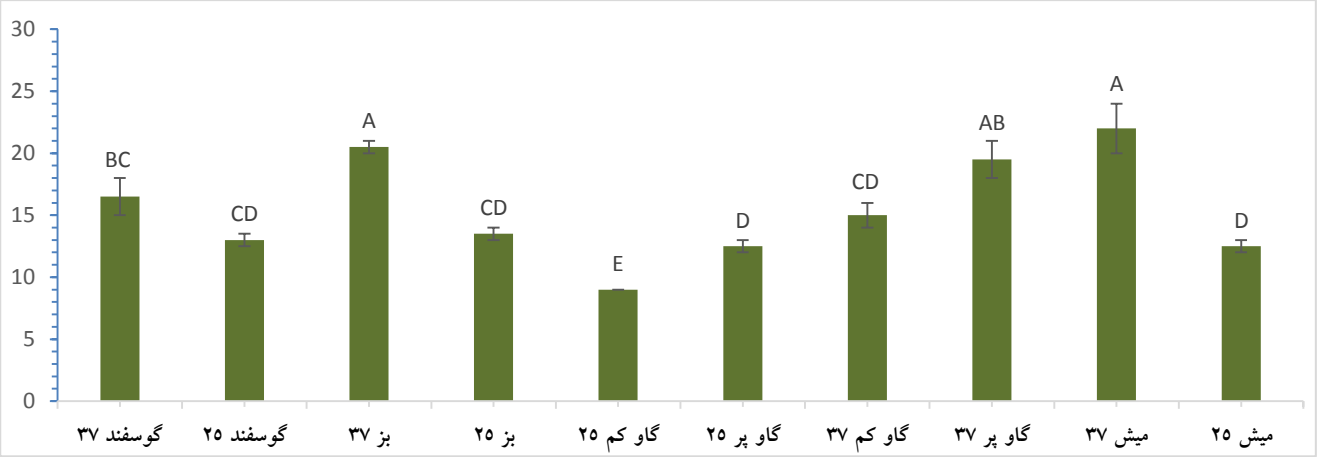


شکل ۲. تاثیر نوع شیر دام مورد استفاده در تهیه نمونه های کفیر در دمای ۲۵ و ۳۷ درجه سانتیگراد بر فعالیت ضدباکتریایی علیه سویه استاندارد *اشریشیا کلی*



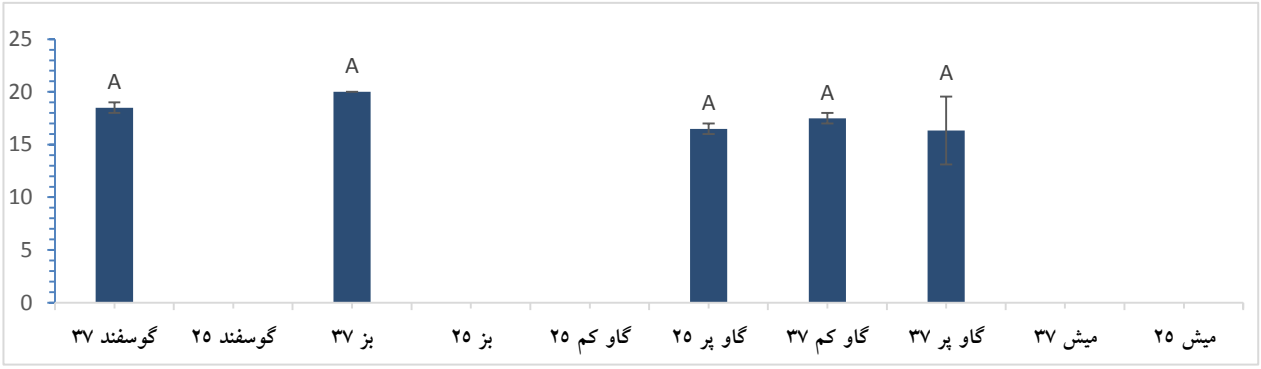
شکل ۳. تاثیر نوع شیر دام مورد استفاده در تهیه نمونه های کفیر در دمای ۲۵ و ۳۷ درجه سانتیگراد بر فعالیت ضدباکتریایی علیه ایزوله بومی *اشریشیا کلی*

یافته‌های آنالیز واریانس یک‌طرفه مربوط به باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* بیانگر وجود تفاوت معنی دار در بین تیمارها بود (P<۰/۰۵) (شکل ۴). بطوریکه بیشترین فعالیت ضدباکتریایی علیه *سودوموناس آئروژینوزا* مربوط به نمونه‌های کفیر تهیه شده با شیر گاومیش، بز و شیر گاو پرچرب هر سه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به ترتیب با میانگین قطر هاله عدم رشد ۲۲، ۲۰ و ۱۹/۵ میلیمتر مشاهده شد (جدول ۱). همچنین کمترین میزان نیز بطور معنی داری به تیمار کفیر شیر گاو کم چرب در دمای ۲۵ درجه اختصاص یافت (P<۰/۰۵).

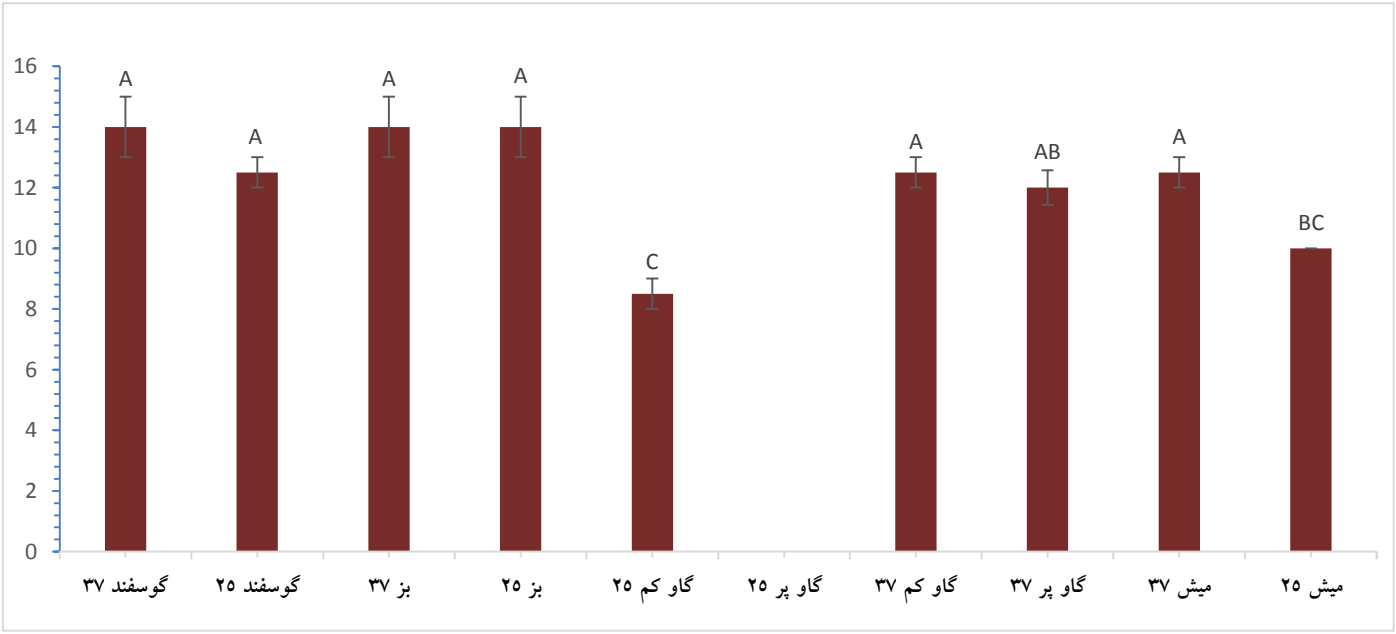


شکل ٤. تاثیر نوع شیر دام مورد استفاده در تهیه نمونه های کفیر در دمای ۲۵ و ۳۷ درجه سانتیگراد بر فعالیت ضدباکتریایی علیه *سودوموناس آئروژینوزا*

نتایج مربوط به اثر ضدباکتریایی نمونه‌های کفیر تهیه شده با شیر دام‌های مختلف در دمای تخمیر ۲۵ و ۳۷ درجه سانتیگراد علیه باکتری گرم منفی *سالمونلا تیفی‌موریوم* بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها بود (P>۰/۰۵) (شکل ۵). در خصوص باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* این نتایج حاکی از وجود تفاوت معنی دار بود (P<۰/۰۵) (شکل ۶). بر این اساس بیشترین فعالیت ضدباکتریایی علیه باکتری گرم منفی *سالمونلا تیفی موریوم* به نمونه های کفیر تهیه شده با شیر بز و گوسفند ۳۷ درجه سانتیگراد به ترتیب با میانگین قطر هاله عدم رشد ۲۰ و ۱۸/۵ میلیمتر بود و بیشترین فعالیت ضدباکتریایی علیه باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* نیز مربوط به همین تیمارها در کنار نمونه‌های تهیه شده با شیر بز در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد با میانگین قطر هاله عدم رشد ۱۴ میلیمتر بود (جدول ۱).



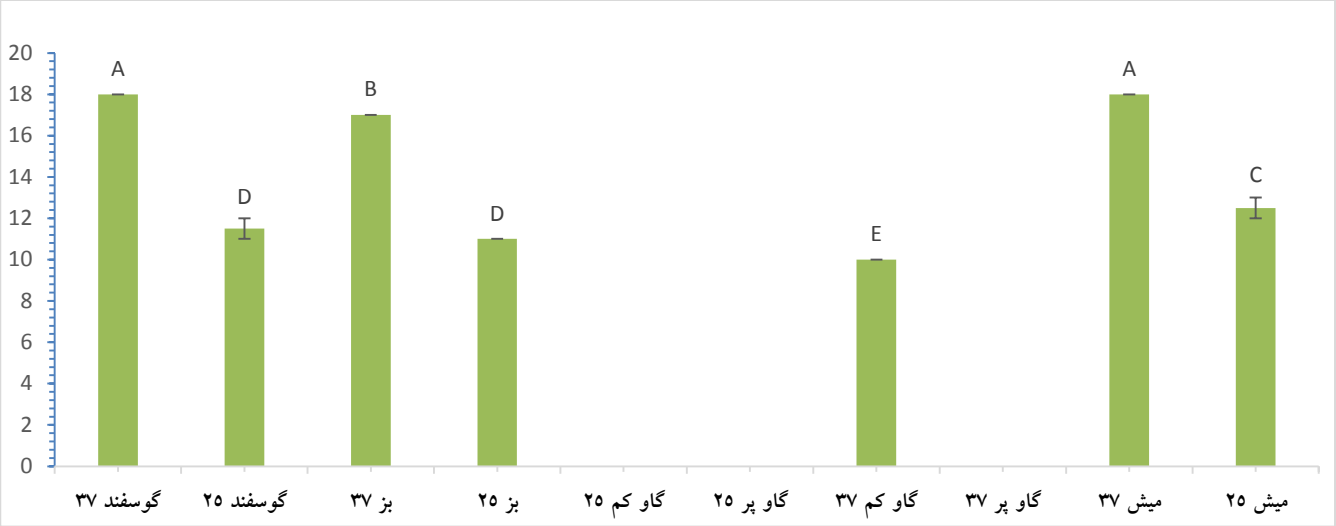
شکل ۵. تاثیر نوع شیر دام مورد استفاده در تهیه نمونه های کفیر در دمای ۲۵ و ۳۷ درجه سانتیگراد بر فعالیت ضدباکتریایی علیه *سالمونلا تیفی موریوم*



شکل ٦. تاثیر نوع شیر دام مورد استفاده در تهیه نمونه های کفیر در دمای ۲۵ و ۳۷ درجه سانتیگراد بر فعالیت ضدباکتریایی علیه *استافیلوکوکوس اورئوس*

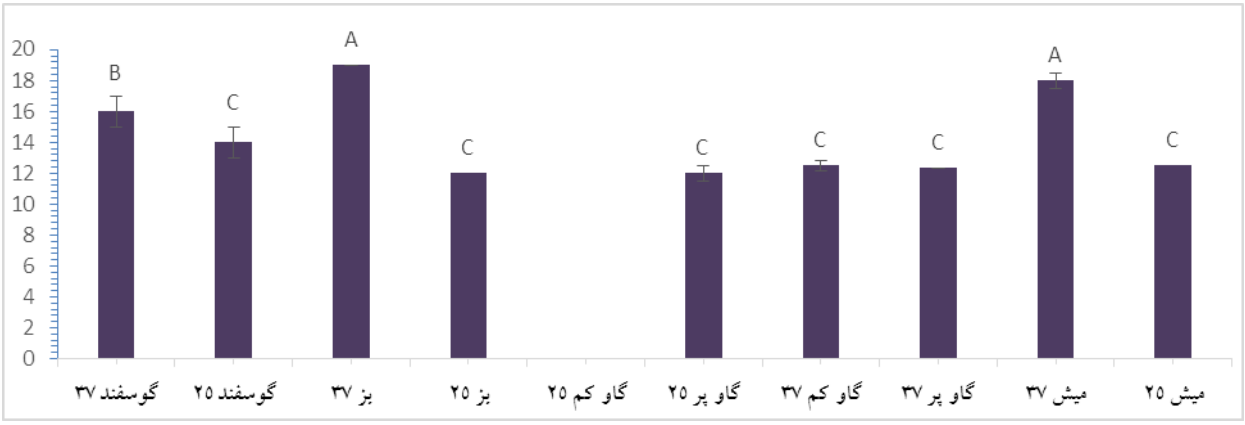
نتایج مربوط به تاثیر نوع شیر دام مورد استفاده در تهیه نمونه‌های کفیر در دمای ۲۵ و ۳۷ درجه سانتیگراد بر فعالیت ضدباکتریایی علیه باکتری گرم مثبت *باسیلوس سرئوس* حاکی از وجود اختلاف معنی در بین تیمارها می‌باشد (P<۰/۰۵) (شکل ۷). بیشترین فعالیت ضدباکتریایی علیه *باسیلوس سرئوس* مربوط به نمونه‌های کفیر تهیه شده با شیر گاومیش و گوسفند در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد با میانگین قطر هاله عدم رشد

۱۸ میلیمتر بود (جدول ۱). و نمونه های تهیه شده با شیر گاو اعم از پرچرب و کم چرب فعالیت ضدباکتریایی نشان ندادند (جدول ۱).



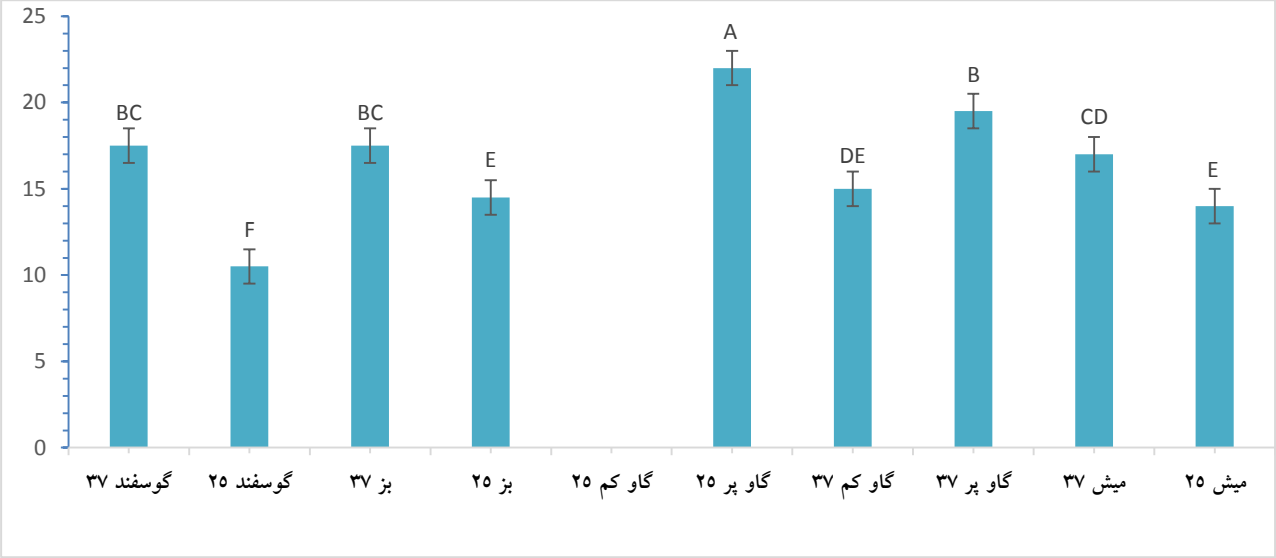
شکل ۷. تاثیر نوع شیر دام مورد استفاده در تهیه نمونه های کفیر در دمای ۲۵ و ۳۷ درجه سانتیگراد بر فعالیت ضدباکتریایی علیه *باسیلوس سرئوس*

نتایج در خصوص باکتری گرم منفی عامل اسهال خونی یعنی *شیگلا دیسانتری* حاکی از وجود اختلاف معنی دار در بین تیمارها می باشد (P<۰/۰۵) (شکل ۸) و نشاندهنده این است که نوع شیر دام مورد استفاده در تهیه نمونه های کفیر در دمای ۲۵ و ۳۷ درجه سانتیگراد بر فعالیت ضدباکتریایی این نوشیدنی تخمیری تاثیر گذار است. بیشترین فعالیت ضدباکتریایی علیه این باکتری مربوط به نمونه‌های کفیر تهیه شده با شیر بز و گاومیش در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به ترتیب با میانگین قطر هاله عدم رشد ۱۹ و ۱۸ میلیمتر است و نمونه تهیه شده با شیر گاو کم چرب در ۲۵ درجه سانتیگراد هیچگونه فعالیت ضدباکتریایی علیه *شیگلا دیسانتری* نشان نداد (جدول ۱).

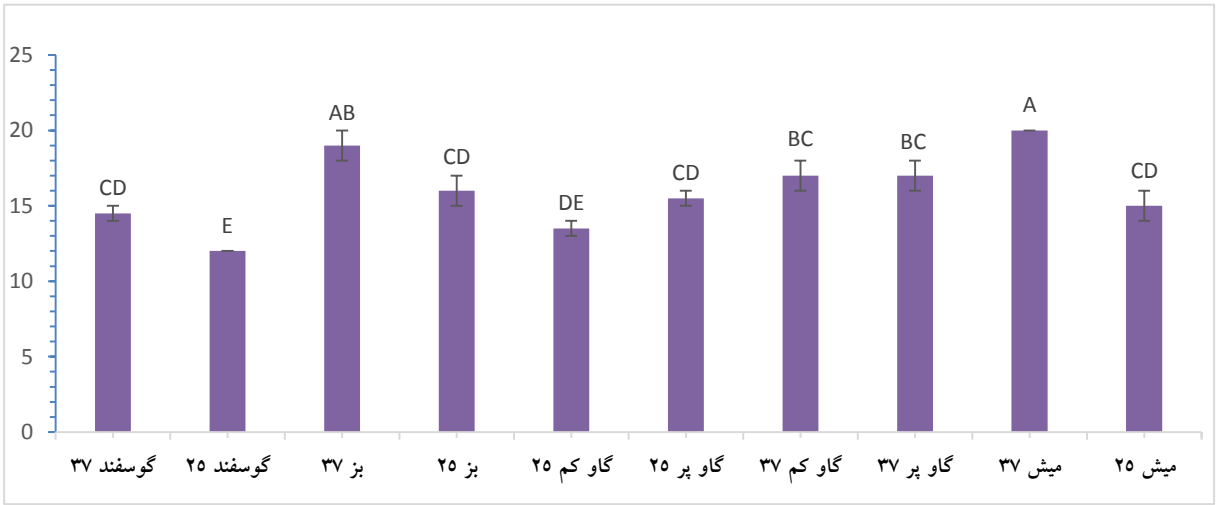


شکل ۸. تاثیر نوع شیر دام مورد استفاده در تهیه نمونه‌های کفیر در دمای ۲۵ و ۳۷ درجه سانتیگراد بر فعالیت ضدباکتریایی علیه *شیگلا دیسانتری*

نتایج نشان داد که فعالیت ضدباکتریایی نمونه های کفیر تهیه شده علیه *کلبسیلا پنومونیه* اعم از سویه استاندارد و ایزوله بومی تحت تاثیر نوع شیر دام مورد استفاده در دمای تخمیر ۲۵ و ۳۷ درجه سانتیگراد است که حاکی از وجود اختلاف معنی دار در بین تیمارها می‌باشد ($P<۰/۰۵$) (شکل ۹و۱۰). بیشترین فعالیت ضدباکتریایی علیه ایزوله بومی این باکتری مربوط به نمونه‌های تهیه‌شده با شیر گاومیش و بز در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به ترتیب با میانگین قطر هاله عدم رشد ۲۰ و ۱۹ میلیمتر می باشد و بیشترین فعالیت ضدباکتریایی علیه سویه استاندارد *کلبسیلا پنومونیه* مربوط به نمونه‌های تهیه شده با شیر گاو پرچرب در دمای ۳۷ و ۲۵ درجه سانتیگراد به ترتیب با میانگین قطر هاله عدم رشد ۲۲ و ۱۹/۵ میلیمتر بود (جدول ۱).

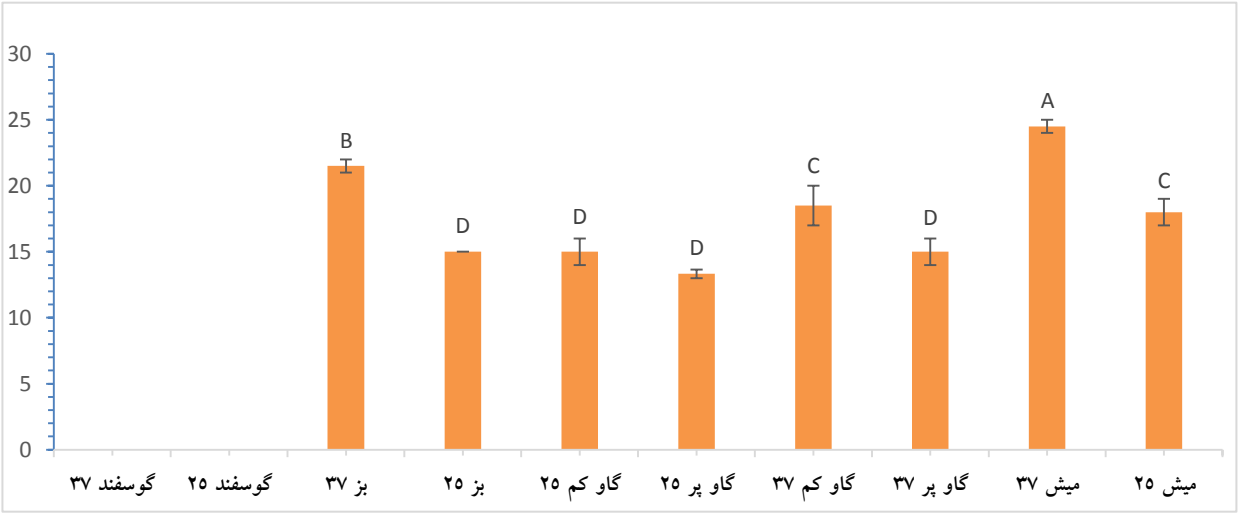


شکل ۹. تاثیر نوع شیر دام مورد استفاده در تهیه نمونه های کفیر در دمای ۲۵ و ۳۷ درجه سانتیگراد بر فعالیت ضدباکتریایی علیه ایزوله بومی *کلبسیلا پنومونیه*



شکل ۱۰. تاثیر نوع شیر دام مورد استفاده در تهیه نمونه های کفیر در دمای ۲۵ و ۳۷ درجه سانتیگراد بر فعالیت ضدباکتریایی علیه سویه استاندارد *کلبسیلا پنومونیه*

یافته های بدست آمده مربوط به تاثیر نوع شیر دام مورد استفاده در تهیه نمونه‌های کفیر در دمای ۲۵ و ۳۷ درجه سانتیگراد بر فعالیت ضدباکتریایی علیه باکتری گرم مثبت *انتروکوکوس فکالیس* حاکی از وجود اختلاف معنی‌دار در بین تیمارها می باشد (P<۰/۰۵) (شکل ۷). نتایج بیشترین فعالیت ضدباکتریایی علیه *انتروکوکوس فکالیس* مربوط به نمونه‌های کفیر تهیه شده با شیر گاومیش و بز در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به ترتیب با میانگین قطر هاله عدم رشد ۲۴/۵ و ۲۱/۵ میلیمتر بود و نمونه‌های تهیه شده با شیر گوسفند فعالیت ضدباکتریایی نشان ندادند (جدول ۱).



شکل ۱۱. تاثیر نوع شیر دام مورد استفاده در تهیه نمونه های کفیر در دمای ۲۵ و ۳۷ درجه سانتیگراد بر فعالیت ضدباکتریایی علیه *انتروکوکوس فکالیس*

ارزیابی حسی نمونه های کفیر تهیه شده با شیر گاو، گاومیش، گوسفند و بز

ارزیابی حسی نمونه‌های کفیر تهیه شده توسط ۱۰ نفر از داوران از افراد داوطلب از نظر ویژگی های حسی شامل آزمون های ظاهرکلی، رنگ، عطر وبو، طعم و احساس دهانی (بافتی) مورد ارزیابی قرار گرفت. اعضای پانل معیار خود از ارزیابی حسی نمونه های کفیر تهیه شده با استفاده از یک مقیاس حسی ۹ نمره‌ای مشخص نمودند. در این مقیاس نمره ۹ خیلی عالی، نمره ۸ عالی، نمره ۷ خوب، نمره ۶ نسبتا خوب، نمره ۵ نه خوب و نه بد، نمره ۴ نسبتا بد نمره ۳ بد، نمره ۲ خیلی بد و نهایتا نمره ۱ فوق العاده بد لحاظ گردید (Meilgaard *et al.*, 1991).

نتایج مربوط به ارزیابی حسی نمونه های کفیر تهیه شده با شیر دامهای مختلف (گاو، گاومیش، گوسفند و بز) در جدول ۲ آمده است. ویژگی‌های حسی شامل آزمون‌های ظاهرکلی، رنگ، عطر و بو، طعم و احساس دهانی (بافتی) بودند. یافته‌ها بیانگر وجود اختلاف معنی‌داری در بین تیمارها در شاخص‌های عطر و بو، طعم، احساس دهان و امتیاز کل بود (P<۰/۰۵) و همچنین اختلاف معنی داری در بین تیمارها در شاخص‌های ظاهر کلی و رنگ مشاهده نشد(P>۰/۰۵).

بطور کلی برآیند نتایج، حاکی از اقبال بیشتر مصرف کننده نسبت به دوغ کفیر گوسفندی و همچنین استقبال کمتر از دوغ کفیر بز بود. در مطالعه Fitrianingsih و همکاران (2021) نتایج نشان داد که غلظت دانه کفیر به طور معنی‌داری (P<۰/۰۵) ، pH، درصد الکل و خواص ارگانولپتیکی را تحت تأثیر قرار می دهد و بین تیمارها نیز تیمار دارای هفت درصد (۷٪) دانه کفیر را بعنوان بهترین غلظت معرفی نمود (Fitrianingsih *et al.*, 2022).

جدول ۲: مقایسه ویژگی های حسی نمونه های کفیر تهیه شده با شیر دامهای مختلف

نوع شیر / ویژگی حسی	گاو	گاو میش	بز	گوسفند	سطح معنی داری
ظاهر کلی	۸± ۱/۴۱^{ab}	۷/۷۱± ۰/۷۵^{ab}	۶/۷۱± ۱/۷۹^{b}	۸/۴۲± ۰/۵۳^{a}	۰/۰۸
رنگ	۷/۷۱± ۱/۷^{a}	۷/۵۷± ۰/۹۷^{a}	۷/۱۴± ۰/۶۹^{a}	۸/۲۸± ۰/۷۵^{a}	۰/۳
عطر و بو	۷/۷۱± ۲/۱۳^{a}	۷/۱۴± ۱/۳۴^{a}	۴/۷۱± ۲/۵۶^{b}	۸/۱۴± ۰/۸۹^{a}	۰/۰۱
طعم	۷/۷۱± ۲/۱۳^{a}	۶/۸۵± ۱/۴۶^{a}	۴/۷۱± ۲/۵۶^{b}	۸/۲۸± ۰/۷۵^{a}	۰/۰۰
احساس دهان	۷/۵۷± ۲/۱۴^{a}	۶/۸۵± ۱/۲۱^{a}	۴/۸۵± ۱/۷۷^{b}	۸± ۱/۱۵^{a}	۰/۰۰
امتیاز کل	۱۸± ۳/۰۵^{a}	۱۷/۷۱± ۱/۲۵^{a}	۱۵/۱۴± ۲/۱۱^{b}	۱۹/۴۲± ۰/۷۸^{a}	۰/۰۰

میانگین±انحراف معیار. حروف مشترک کوچک در هر ردیف بیانگر عدم وجود اختلاف معنی دار در بین تیمارها می باشد(P≥۰/۰۵).

بحث

نتایج این تحقیق حاکی از فعالیت ضدباکتریایی قابل توجه نمونه های کفیر تهیه شده با شیر دامهای مختلف علیه باکتریهای مورد آزمون بود و نوع شیر دام مورد استفاده در تهیه نمونه‌های کفیر در دمای ۲۵ و ۳۷ درجه سانتیگراد تاثیر معناداری بر فعالیت ضدباکتریایی علیه همه باکتریهای مورد آزمون به استثناء *سالمونلا تیفی‌موریوم* داشت (P<۰/۰۵) بطوریکه بیشترین فعالیت ضدباکتریایی علیه باکتریهای *سودوموناس آئروژینوزا*، *انتروکوکوس فکالیس*، ایزوله بومی *کلبسیلا پنومونیه* و *باسیلوس سرئوس* مربوط به نمونه های تهیه شده با شیر گاومیش و در دمای تخمیر ۳۷ درجه سانتیگراد مشاهده شد. همچنین بیشترین فعالیت ضدباکتریایی علیه باکتریهای *شیگلا دیسانتری*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سالمونلا تیفی موریوم* به نمونه های کفیر تهیه شده با شیر بز و در دمای تخمیر ۳۷ درجه سانتیگراد مربوط می شود. بیشترین فعالیت ضدباکتریایی علیه سویه استاندارد *اشریشیا کلی* و *باسیلوس سرئوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* در نمونه های کفیر تهیه شده با شیر گوسفند و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد مشاهده شد. حساس‌ترین باکتریهای بیماریزای مورد مطالعه به نمونه های کفیر تهیه شده با شیر گاو پرچرب ایزوله بومی *اشریشیا کلی* و سویه استاندارد *کلبسیلا پنومونیه* بودند.

نتایج تحقیق Suhartanti and Septian (2014) نشان داد که کفیر شیر بز در مقایسه با کفیر شیر گاو فعالیت ضدباکتریایی بهتری در برابر *باسیلوس سرئوس* دارد (Suhartanti and Septian, 2014).

Azizkhani و همکاران (2020) در مطالعه فعالیت ضد باکتریایی و ضدقارچی نمونه های کفیر تهیه شده با شیر

گاو، گوسفند، بز و شتر نشان دادند که کفیر حاصل از شیر گوسفند و گاو بترتیب دارای بیشترین و کمترین فعالیت ضدمیکروبی هستند. *استافیلوکوکوس اورئوس*، *لیستریا مونوسایتوژنز* حساس‌ترین باکتریها و *آسپرژیلوس نایجر* حساس‌ترین قارچ نسبت به نمونه‌های کفیر گزارش شدند و *اشریشیا کلی* و گونه پنی‌سیلیوم مقاومترین میکروارگانیسمها نسبت به نمونه های کفیر بودند. در مجموع فعالیت بازدارندگی نمونه ها در برابر باکتری های مورد آزمایش در این تحقیق به ترتیب کفیر میش، کفیر بز، کفیر شتر، کفیر گاو، بود (Azizkhani *et al.*, 2020).

همچنین، de Lima و همکاران(2018) نشان داد که کفیر برزیلی تولید شده از شیر تخمیر شده گوسفند منبع غنی از متابولیتهای ضدمیکروبی و آنتی اکسیدانی است (de Lima *et al.*, 2018).

در مطالعه ای توسط Said و همکاران (2019)، فعالیت ضدمیکروبی کفیر شیر بز بر روی *اشریشیا کلی* و *سالمونلا تیفی موریوم* نشان داده شد (Said *et al.*, 2019).

مطالعه Biadała و همکاران (2020) نشان داد که در طی تخمیر شیر بز با میکروارگانیسم‌های منفرد دانه‌های کفیر، مواد فعال زیستی تشکیل می‌شوند که دارای خواص ضدباکتریایی در برابر مهمترین سویه ها سویه‌ها در زمینه بهداشت مواد غذایی از جمله *اشریشیا کلی* و سالمونلا هستند (Biadala *et al.*, 2020).

تفاوت در فعالیتهای بیولوژیک از جمله فعالیت ضدباکتریایی نمونه‌های کفیر تهیه شده از منابع مختلف (شیر دامهای مختلف) می‌تواند تحت تاثیر پارامترهای متعددی مانند ترکیب اسیدهای چرب، محتوای لاکتوز که تاثیر قابل توجهی بر PH نهایی و اسیدیته محصول دارد، انواع پپتیدها و ترکیبات شیمیایی دیگر که در تولید ترکیبات فعال زیستی نقش دارند، نوع و جمعیت میکروارگانیسم‌ها و تنوع آنزیم های دانه کفیر و کشت استارتر باشد (Azizkhani *et al.*, 2020).

نتایج نشان داد که نمونه های کفیر تهیه شده در ۳۷ درجه سانتیگراد در مقایسه با نمونه های کفیر تهیه شده در ۲۵ درجه سانتیگراد فعالیت ضدباکتریایی بیشتری علیه باکتریهای بیماریزای مورد آزمون نشان دادند. با وجود اینکه، کفیرهای سنتی در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و به مدت ۲۴-۱۸ ساعت تهیه می‌شوند (Farnworth and Mainville, 2008). مطالعه Ajam and Koohsari (2020) نشان داد که دمای تخمیر بر فعالیت ضدباکتریایی نمونه های کفیر تهیه شده با شیر گاو علیه *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیا کلی* و *باسیلوس سرئوس* تاثیر معناداری داشت و با در نظر گرفتن تمامی فاکتورها و اثرات متقابل آنها، بیشترین فعالیت ضدباکتریایی در نمونه های کفیر تخمیر شده در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد مشاهده گردید (Ajam and Koohsari, 2020).

بطور کلی نتایج حاکی از فعالیت ضدباکتریایی قابل توجه نمونه های کفیر تهیه شده با شیر دامهای مختلف علیه باکتریهای مورد آزمون است. این فعالیت ضدباکتریایی با تولید اسیدهای آلی، پپتیدها (باکتریوسین ها)، دی اکسید کربن، پراکسید هیدروژن، اتانول و دی‌استیل ارتباط دارد (Leite *et al.*, 2013). علاوه بر این ترکیبات، اگزوپلی ساکارید تولید شده بوسیله دانه های کفیر به نام کفیران نیز دارای فعالیت‌های ضدباکتریایی می‌باشد (Wang *et al.*, 2008; Prado *et al.*, 2015).

از مکانیسمهای فعالیت ضدباکتریایی عصاره های کفیر، می‌توان به pH اسیدی، در نتیجه تخمیر لاکتوز و افزایش محتوای اسیدهای آلی، همچون اسید لاکتیک،

اسید استیک و ... توسط میکروارگانیسم‌های موجود در دانه های کفیر اشاره کرد. اسید لاکتیک از طریق غشاء سیتوپلاسمی نفوذ می کند و باعث اسیدی شدن سیتوپلاسم و مهار فعالیت آنزیم ها می شود. در pH داخل سلولی بیشتر اسیدها منجر به تولید یون‌های هیدروژن می‌شوند که با اعمال متابولیکی مهم همچون فسفریلاسیون اکسیداتیو تداخل می کنند و باعث مهار گونه های هوازی می شوند. علاوه بر این، مشخص شد که اسید لاکتیک و استیک وقتی در عصاره کفیر با هم تولید می‌شوند، اثر مهاری هم‌افزایی عالی دارند و این اثر به تقویت اسید استیک در کاهش pH توسط اسید لاکتیک مربوط می‌شود (Farnworth, 2006).

تصور می شود که باکتریوسین ها با خراب کردن (Corrupting) یون پتاسیم و ATP، پتانسیل غشاها را تغییر می دهند و باعث می‌شوند سلول ها نتوانند pH داخل سلول را متعادل کنند (Sezar and Guven, 2009).

میکروارگانیسم‌های موجود در دانه‌های کفیر به وسیله ماتریکس پروتئینی و پلی ساکاریدی به نام کفیران احاطه شده‌اند. کفیران یک گلوکوگالاکتان منشعب محلول در آب است که از مقادیر یکسان D-گالاکتوز و D-گلوکز تشکیل شده است. تولید کفیران بیشتر توسط گونه های *لاکتوباسیلوس کفیرانوفاسینس* و *لاکتوباسیلوس کفیر* صورت می گیرد. فعالیت‌های ضدباکتریایی، ضدقارچی و ضدتوموری نوشیدنی کفیر را به کفیران نسبت می‌دهند. تولید کفیران میتواند به طور چشم‌گیری با کنترل شرایط کشت و اصلاح ترکیب واسطه، افزایش یابد، همچنین افزایش دانه های کفیر و تولید کفیران با اضافه کردن منابع معدنی تحریک می‌شود (Frengova *et al.*, 2002; Zajšek and Goršek, 2011).

به این واسطه تفاوتهای موجود در فعالیت ضدباکتریایی نمونه های مختلف را می توان به تفاوتهای موجود در شرایط تخمیر و نوع شیر مورد استفاده و البته حساسیت سویه های مختلف باکتریایی نسبت داد.

نقش‌های بیولوژیک این نوشیدنی تخمیری به ترکیبات موجود در محصول نهایی، میکروارگانیسمهای موجود در دانه‌های کفیر و ترکیبات حدواسط ناشی از متابولیسم آنها مربوط می شود. تفاوت در مقدار و نوع این میکروارگانیسمها و ترکیبات حدواسط با شرایط تخمیر از قبیل زمان، تخمیر، دما، درجه همزن، نوع شیر، نسبت تلقیح دانه‌ها همچنین pH و حساسیت‌های سویه‌های مختلف باکتریایی به آن ارتباط دارد (Simova *et al.*, 2002; Wszolek *et al.*, 2006; Rattray and O'Connell, 2011).

در مطالعه Ajam and Koohsari (2020) نمونه های تخمیر شده در شیر پرچرب فعالیت ضدباکتریایی بیشتری را علیه *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیا کلی*، *باسیلوس سرئوس* و *شیگلا دیسانتری* نشان دادند (Ajam and Koohsari, 2020).

با در نظر گرفتن اینکه بسیاری فعالیت ضدباکتریایی نوشیدنی کفیر را به ترکیب پلی ساکاریدی کفیران نسبت می دهند، Zajšek و Goršek (2011) نیز با هدف بررسی نیازمندی های رشد برای تولید کفیران از دانه های کفیر، بهترین شرایط برای تولید کفیران از دانه‌های کفیر را شیر پرچرب گاو معرفی کردند که با وقوع بیشترین فعالیت ضدباکتریایی در شرایط مذکور، همخوانی دارد (Zajšek and Goršek, 2011).

Florence و همکاران (2012) شیر خام را به عنوان سوبسترای مناسب برای تهیه شیرهای تخمیری پیشنهاد دادند (Florence *et al.*, 2012).

فعالیت‌های ضدباکتریایی نوشیدنی کفیر را به کفیران نسبت می‌دهند و تولید کفیران می‌تواند به طور چشم‌گیری با کنترل شرایط کشت افزایش یابد (Frengova *et al.*, 2002; Zajšek and Goršek, 2011).

با تمام این تفاسیر، رشد دانه های کفیر در محیط های کشت مختلف، به حضور و میزان سوبستراهای مورد نیاز برای رشد میکروارگانیسمهای موجود در دانه های کفیر از جمله پروتئین و لاکتوز وابسته است و مقادیر ترکیبات اصلی شیر می‌تواند به طور قابل توجهی بین دامها و نژادهای مختلف و بسته به نوع خوراک متفاوت باشد (Bylund, 1995).

ترکیب شیمیایی، محتویات معدنی و ویتامین های شیر بدست آمده از حیوانات مختلف به دلیل چندین عامل مهم بسیار متفاوت است و به دلیل تفاوت در ترکیبات شیمیایی شیرهای مختلف، تفاوت هایی در کیفیت و ویژگی های مرتبط با سلامت محصولات وجود دارد (Morand-Fehr *et al.*, 2007). به همین دلایل نوع سوبسترا (شیر) مورد استفاده در فرایند تخمیر به وسیله دانه های کفیر در فعالیت های بیولوژیک این نوشیدنی از جمله فعالیتهای ضدباکتریایی آن نقش بسزایی دارد. از طرفی تفاوت در نتایج مطالعه حاضر با دیگر مطالعات ممکن است به دلیل تفاوت در منشاء کفیر مورد آزمون باشد. تفاوت در فعالیت ضدباکتریایی نمونه های کفیر با منشاء مختلف در مطالعات دیگر نیز گزارش شده است (Pintado *et al.*, 1996; Anderson *et al.*, 1999).

تفاوتهای منطقه‌ای و شرایط تخمیر می‌تواند تنوع میکروبی در دانه‌های کفیر را تغییر دهد و تنوع میکروبی مسئول فعالیتهای بیولوژیکی است (Kukhtyn *et al.*, 2018). تنوع میکروبی مسئول فعالیت‌های بیولوژیکی و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی کفیر است و بسته به منشأ منطقه‌ای دانه‌های کفیر، تنوع میکروبی آنها متفاوت است و بنابراین، فعالیت ضد باکتریایی آن نیز تغییر می‌کند (Gao *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2009; Kabak and Dobson, 2011; Altay *et al.*, 2013).

نتیجه‌گیری

بطورکلی نتایج این تحقیق نشان داد، نوع شیر دام مورد استفاده در تهیه نمونه های کفیر در دمای ۲۵ و ۳۷ درجه سانتیگراد تاثیر معناداری بر فعالیت ضدباکتریایی علیه همه باکتریهای مورد آزمون به استثناء *سالمونلا تیفی موریوم* داشت. نمونه های کفیر تهیه شده در ۳۷ درجه سانتیگراد در مقایسه با نمونه های کفیر تهیه شده در ۲۵ درجه سانتیگراد فعالیت ضدباکتریایی بیشتری علیه باکتریهای بیماریزای مورد آزمون نشان دادند. برای دستیابی به بیشترین فعالیت ضدباکتریایی علیه باکتریهای *سودوموناس آئروژینوزا*، *انتروکوکوس فکالیس*، ایزوله بومی *کلبسیلا پنومونیه* و *باسیلوس سرئوس*، تهیه کفیر با شیر گاومیش، علیه *شیگلا دیسانتری*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سالمونلا تیفی موریوم* شیر بز، علیه سویه استاندارد *اشریشیا کلی* و *باسیلوس سرئوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* شیر گوسفند و علیه ایزوله بومی *اشریشیا کلی* و سویه استاندارد *کلبسیلا پنومونیه* شیر گاو پرچرب پیشنهاد می شود. همچنین با توجه به حصول فعالیت ضدباکتریایی بیشتر در نمونه های تهیه شده در دمای تخمیر ۳۷ درجه سانتیگراد، انجام فرایند تخمیر در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد برای دستیابی به فعالیت ضدباکتریایی بیشتر پیشنهاد می شود. با توجه به فعالیت ضدباکتریایی قابل توجه نمونه های کفیر تهیه شده با شیر گاومیش، بز و گوسفند، استفاده از شیر این دامها به عنوان سوبسترای مناسب و جایگزین شیر گاو برای تهیه این نوشیدنی تخمیری توصیه می شود.

منابع

1. Ajam, F. and Koohsari, H., 2020. Effect of some fermentation conditions on antibacterial activity of fermented milk by kefir grains. *Journal of Food Processing and Preservation.* **44**(12), 14913. DOI: 10.1111/jfpp.14913
2. Altay, F., Karbancıoglu-Güler, F., Daskaya-Dikmen, C. and Heperkan, D., 2013. A review on traditional Turkish fermented non-alcoholic beverages: Microbiota, fermentation process and quality characteristics. *International journal of food microbiology.* **167**(1), 44-56. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.06.016. PMID: **23859403**
3. Anderson, J.W. and Gilliland, S.E., 1999. Effect of fermented milk (yogurt) containing Lactobacillus acidophilus L1 on serum cholesterol in hypercholesterolemic humans. *Journal of the American College of Nutrition.* **18**(1), 43-50. DOI: 10.1080/07315724.1999.10718826. PMID: **10067658**
4. Azizkhani, M., Saris, P.E.J. and Baniasadi, M., 2021. An in-vitro assessment of antifungal and antibacterial activity of cow, camel, ewe, and goat milk kefir and probiotic yogurt. *Journal of Food Measurement and Characterization.* **15**(4), 406-415. DOI: 10.1007/s11694-020-00645-4
5. Biadała, A., Szablewski, T., Lasik-Kurdyś, M. and Cegielska-Radziejewska, R., 2020. Antimicrobial activity of goat's milk fermented by single strain of kefir grain microflora. *European food research and technology.* **246**(5), 1231-1239. DOI: 10.1007/s00217-020-03483-2
6. Bylund, G. (1995). Dairy Processing Handbook. Tetra Pak Processing Systems AB, S-221 86 Lund.

7. de Lima, M.D.S.F., da Silva, R.A., da Silva, M.F., da Silva, P.A.B., Costa, R.M.P.B., Teixeira, J.A.C., Porto, A.L.F. and Cavalcanti, M.T.H., 2018. Brazilian kefir-fermented sheep's milk, a source of antimicrobial and antioxidant peptides. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. **10**(3), 446-455. DOI: 10.1007/s12602-017-9365-8. PMID: **29285743**
8. Farnworth, E.R., 2006. Kefir–a complex probiotic. *Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods*. **2**(1), 1-17. DOI: 10.1616/1476-2137.13938
9. Farnworth, E.R. and Mainville, I. 2008. Kefir - a fermented milk product. In: Handbook of fermented functional foods. 2nd ed. Farnworth, E. R. (ed) CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, London, New York, pp. 89-127.
10. Fitrianingsih, F., Hafid, H., Kimestri, A.B., Sulfitrana, A. and Toba, R.D.S., 2022, March. The Effect of Different Kefir Grain Starter Concentration on pH, Alcohol Percentage, and Organoleptic Properties of Ultra High Temperature (UHT) Milk Kefir. In *International Conference on Improving Tropical Animal Production for Food Security (ITAPS 2021)* (pp. 399-403). Atlantis Press. DOI: 10.2991/absr.k.220309.078
11. Florence, A.C.R., Oliveira, R.P., Silva, R.C., Soares, F.A., Gioielli, L.A. and Oliveira, M.N., 2012. Organic milk improves Bifidobacterium lactis counts and bioactive fatty acids contents in fermented milk. *LWT*. **49**(1), 89-95. DOI:10.1016/j.lwt.2012.04.023
12. Frengova, G.I., Simova, E.D., Beshkova, D.M. and Simov, Z.I., 2002. Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria of kefir grains. *Zeitschrift für Naturforschung C*. **57**(9-10), 805-810. DOI: 10.1515/znc-2002-9-1009. PMID: **12440716**
13. Fuller, R., 1989. Probiotics in man and animals. *The Journal of applied bacteriology*. **66**(5), 365-378.
14. Gao, J., Gu, F., Abdella, N.H., Ruan, H. and He, G., 2012. Investigation on culturable microflora in Tibetan kefir grains from different areas of China. *Journal of food science*, **77**(8), M425-433. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2012.02805.x. PMID: **22860591**
15. Garbers, I.M., Britz, T.J. and Witthuhn, R.C., 2004. PCR-based denaturing gradient gel electrophoretictypification and identification of the microbial consortium present in kefir grains. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. **20**(7), 687-693. DOI: 10.1007/s11274-004-2624-3
16. Guzel-Seydim, Z.B., Kok-Tas, T., Greene, A.K. and Seydim, A.C., 2011. Functional properties of kefir. *Critical reviews in food science and nutrition*. **51**(3), 261-268. DOI: 10.1080/10408390903579029. PMID: **21390946**
17. İrkin, R. and Berkkacan, E.G., 2022. Improving Some Properties of Cow and Goat Mixed Milk Based Kefir with Inulin Addition as a Functional Food. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi.* **25**(3), 556-564. DOI: 10.18016/ksutarimdoga.vi.895501
18. Zhou, J., Liu, X., Jiang, H. and Dong, M., 2009. Analysis of the microflora in Tibetan kefir grains using denaturing gradient gel electrophoresis. *Food microbiology*. **26**(8), 770-775. DOI: 10.1016/j.fm.2009.04.009. PMID: **19835760**
19. Kabak, B. and Dobson, A.D., 2011. An introduction to the traditional fermented foods and beverages of Turkey. *Critical reviews in food science and nutrition*. **51**(3), 248-260.

83822013000200001.
PMID: **24294220**

26. Pintado, M.E., Da Silva, J.L., Fernandes, P.B., Malcata, F.X. and Hogg, T.A., 1996. Microbiological and rheological studies on Portuguese kefir grains. *International journal of food science & technology*. **31**(1), 15-26. DOI: 10.1111/j.1365-2621.1996.16-316.x
27. Pop, C., Apostu, S., Salanță, L., Rotar, A.M., Sindic, M., Mabon, N. and SOCACIU, C., 2014. Influence of different growth conditions on the kefir grains production used in the kefiran synthesis. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca: Food Science and Technology*. **71**(2), 147-153. DOI: 10.15835/buasvmcn-fst:10802
28. Prado, M.R., Blandón, L.M., Vandenberghe, L.P., Rodrigues, C., Castro, G.R., Thomaz-Soccol, V. and Soccol, C.R., 2015. Milk kefir: composition, microbial cultures, biological activities, and related products. *Frontiers in microbiology*. **6**.1177.
DOI: 10.3389/fmicb.2015.01177.
PMID: **26579086**
29. Rattray, F.P. and O'Connell, M.J. (2011). Fermented Milks Kefir. In: Fukay, J. W. (ed.), Encyclopedia of Dairy Sciences (2th ed). Academic Press, San Diego, USA, p.518-524.
30. Said, N., Fahrodi, D.U., Malaka, R. and Maruddin, F., 2019, March. Assessment of the antibacterial activity of goat milk kefir on Escherichia coli ATCC 8739 and Salmonella enteric subsp. enterica serovar typhimurium ATCC 14028 using a well diffusion method. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 247, No. 1, p. 012051). IOP Publishing. DOI: 10.1088/1755-1315/247/1/012051

DOI: 10.1080/10408390903569640.
PMID: **21390945**

20. Khan, R.A.A., Najeeb, S., Mao, Z., Ling, J., Yang, Y., Li, Y. and Xie, B., 2020. Bioactive secondary metabolites from Trichoderma spp. against phytopathogenic bacteria and root-knot nematode. *Microorganisms*. **8**(3), 401.
DOI: 10.3390/microorganisms803040 1. PMID: **32182971**
21. Kourkoutas, Y., Sipsas, V., Papavasiliou, G. and Koutinas, A.A., 2007. An economic evaluation of freeze-dried kefir starter culture production using whey. *Journal of dairy science*. **90**(5), 2175-2180. DOI: 10.3168/jds.2006-557.
PMID: **17430915**
22. Kukhtyn, M., Vichko, O., Horyuk, Y., Shved, O. and Novikov, V., 2018. Some probiotic characteristics of a fermented milk product based on microbiota of "Tibetan kefir grains" cultivated in Ukrainian household. *Journal of food science and technology*. **55** (1), 252-257. DOI: 10.1007/s13197-017-2931-y
23. Meilgaard, M.C., Civille, G.V., and Carr, B.T. (1991). Sensory evalution techniques. 2nd edition. Crc prees, inc. bocaration, florida. pp: 345-386.
24. Morand-Fehr, P., Fedele, V., Decandia, M. and Le Frileux, Y., 2007. Influence of farming and feeding systems on composition and quality of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research.* **68**(1-2), 20-34. DOI:10.1016/j.smallrumres.2006.09.0 19
25. Leite, A.M.D.O., Miguel, M.A.L., Peixoto, R.S., Rosado, A.S., Silva, J.T. and Paschoalin, V.M.F., 2013. Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: a natural probiotic beverage. *Brazilian journal of microbiology*. **44**(2), 341-349. DOI: 10.1590/S1517-

31. Sezar, Ç. and Guven, A., 2009. Investigation of bacteriocin production capability of lactic acid bacteria isolated from foods. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **15**(1), 45-50. DOI:10.9775/kvfd.2008.56-A
32. Simova, E., Beshkova, D., Angelov, A., Hristozova, T.S., Frengova, G. and Spasov, Z., 2002. Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. **28**(1), 1-6. DOI: 10.1038/sj/jim/7000186. PMID: **11938463**
33. Suhartanti, D. and Septian, R., 2014. *Comparison of the antibacterial activity of cow milk kefir and goat milk kefir against bacteria Bacillus cereus*. *KESMAS*. **8**(2), 71-76. DOI: 10.12928/kesmas.v8i2.1030.
34. Wszolek, M., Kupiec- Teahan, B., Skov Guldager, H. and Tamime, A.Y., 2006. Production of kefir, koumiss and other related products. *Fermented milks*, pp.174-216. DOI: 10.1002/9780470995501.ch8.
35. Wang, Y., Ahmed, Z., Feng, W., Li, C. and Song, S., 2008. Physicochemical properties of exopolysaccharide produced by Lactobacillus kefiranofaciens ZW3 isolated from Tibet kefir. *International Journal of Biological Macromolecules*. **43**(3), 283-288. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2008.06.011. PMID: **18662712**
36. Weinstein, M. P., Patel, J. B., Burnham, C. A., Campeau, S., Conville, P. S., Doern, C., … Zimmer, B. L. (2018). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. In Clinical and laboratory standard institute (Vol. M07, 11th ed., pp. 15–35). Pennsylvania, USA. Wayne.
37. Zajšek, K. and Goršek, A., 2011. Experimental assessment of the impact of cultivation conditions on kefiran production by the mixed microflora imbedded in kefir grains. *Chemical Engineering Transactions*. **24**, 481-486. DOI: 10.3303/CET1124081.

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 19, Issue 1, Spring & Summer 2023

Investigation of Antibacterial Activity of Kefir Samples Prepared with Cow, Buffalo, Ewe and Goat Milk against a Number of Pathogenic Bacteria

Araz Soltan Saedifar[1], Hadi Koohsari*[2], Maryam Sadegh Shesh Poli[3]

1. MSc, Department of Microbiology, Minudasht branch, Islamic Azad University, Minudasht, Iran

2. Associate Professor, Department of Microbiology, Azadshahr branch, Islamic Azad University, Azadshahr, Iran

3. Ph. D of Molecular Medicine, Department of Microbiology, Gorgan branch, Islamic Azad University, Gorgan, Iran

Received: 8 August 2023 *Accepted: 5 December 2023*

Abstract

Kefir is a complex probiotic, and a microbial symbiosis collection that is prepared from milk fermentation by kefir grains. The type of substrate (milk) used to prepare this fermented beverage is effective on its biological activities, including its antibacterial activity. The purpose of this study is to investigate the antibacterial activity of kefir samples prepared with cow, buffalo, ewe and goat milk. Activated kefir grains were added to cow (Full-fat and low-fat), buffalo, ewe, and goat milk, and the fermentation process was performed at 25°C and 37°C. After the fermentation process, kefir grains were separated from kefir extract and the antibacterial activity of the extract against 10 pathogenic bacteria was evaluated based on agar diffusion and by the well method. The type of milk used in the preparation of kefir samples at 25°C and 37°C had a significant effect on antibacterial activity against all tested bacteria except S. typhimurium ($P<0.05$). Kefir samples prepared at 37°C compared to kefir samples prepared at 25°C showed more antibacterial activity. The highest antibacterial activity against the P. aeruginosa, E. faecalis, K. pneumoniae native isolate and B. cereus in the samples prepared with buffalo milk and at the fermentation temperature of 37°C, respectively, with the mean of diameter of inhibition zone of 22, 24.5, 20 and 18 mm was observed. The highest antibacterial activity against S. dysenteriae, S. aureus and S. typhimurium is related to kefir samples prepared with goat's milk and at fermentation temperature of 37°C. The highest antibacterial activity against the standard strain of E. coli, B. cereus, and S. aureus was observed in kefir samples prepared with ewe milk at 37°C. The most sensitive bacteria studied to the samples prepared with full-fat cow's milk were E. coli native isolate and K. pneumoniae standard strain. In the final conclusion considering the antibacterial activity of kefir samples prepared with buffalo, goat and ewe milk, it is recommended to use the milk of these animals as a suitable substrate and substitute for cow's milk to prepare this fermented beverage. Also, it is suggested to perform the fermentation process at 37°C to achieve more antibacterial activity.

Keywords: Kefir, Antibacterial activity, Cow milk, Buffalo milk, Ewe milk, Goat milk

**Corresponding author:* Hadi Koohsari

Address: Department of Microbiology, Azadshahr Branch, Islamic Azad University, Azadshahr, Golestan, Iran

E. mail: hadikoohsari@yahoo.com