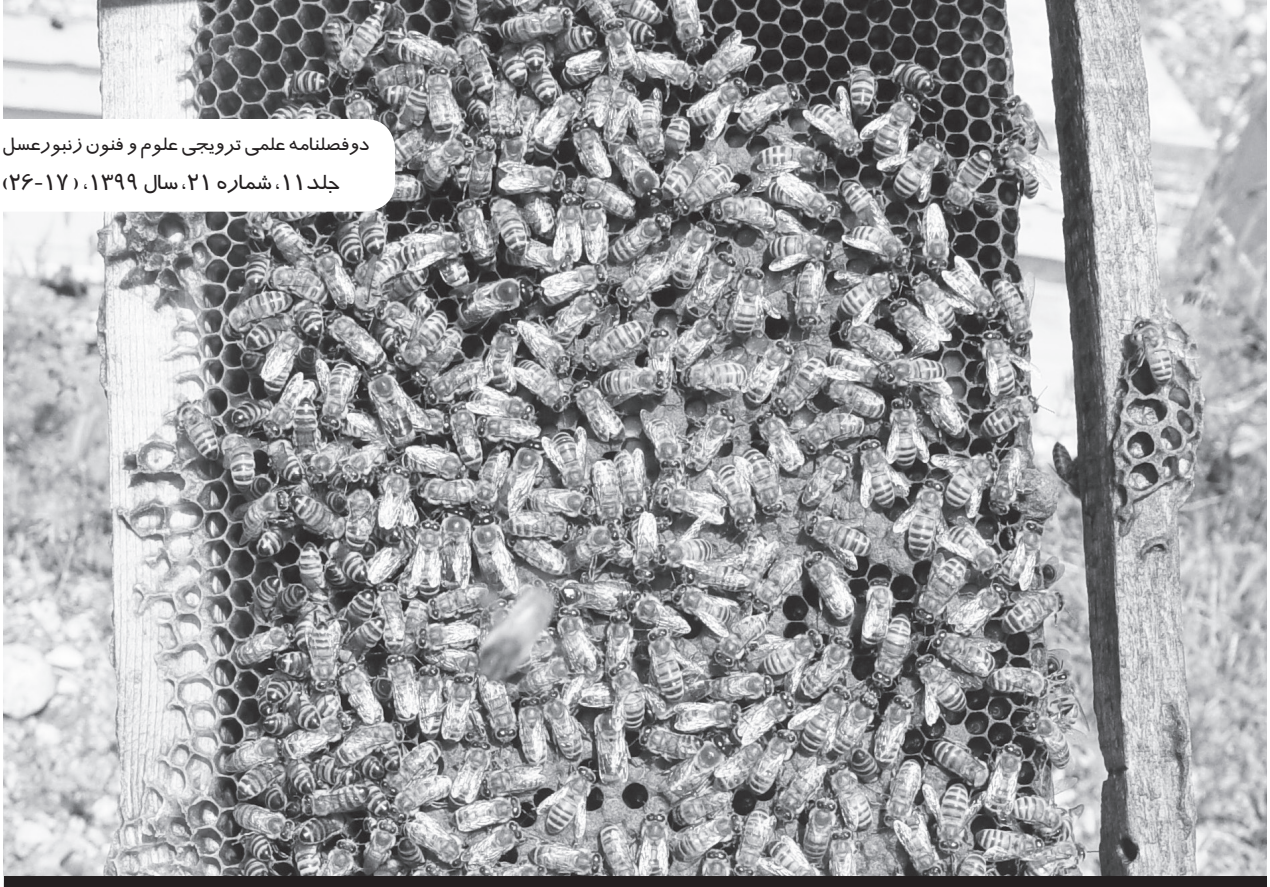
دوفصلنامه علمی ترویجی علوم و فنون زنبورعسل
جلد ۱۱، شماره ۲۱، سال ۱۳۹۹، (۱۷-۲۶)



بررسی اثر آنتی‌باکتریال ترکیب فراسودمند قارچ پروبیوتیک کامبوجا (kombucha) در عسل

محیا سلطانی[۱]، محسن فرشادفر[۲]، هومن شیروانی[۳]، آنیتا یاقوتی پور[۴]

۱-گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

۲-دانشیار گروه کشاورزی دانشگاه پیام نور تهران، ایران

۳-مدرس گروه کشاورزی دانشگاه پیام نور تهران، ایران

۴-دکترای اصلاح نباتات، گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

تاریخ دریافت: آبان ماه ۹۹ / **تاریخ پذیرش**: بهمن ماه ۹۹

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/HBSJ.2021.352603.1095

رایانامه: mahyasoltani7113@gmail.com

چکیده:

کامبوجا (kombucha) ترکیبی طبیعی در طب سنتی چینی بوده که از دیر باز مورد استفاده قرار گرفته است و متشکل از باکتری‌ها و مخمرهای مفید می‌باشد که در تولید فرآورده‌ها و نوشیدنی‌های فراسودمند به کار می‌رود. همچنین عسل از دیرباز مورد استفاده بوده و خواص دارویی و شفابخش آن از گذشته‌های دور به اثبات رسیده است. در این مطالعه اثر آنتی‌باکتریال ترکیب قارچ کامبوجیا در عسل به نسبت ۱ به ۵ بر تعدادی از میکرواورگانیسم‌ها (سودوموناس آئروژنز، استافیلوکوکوس اورئوس و ایشریشیاکلای، آنتروکوکوس فکالیس) در ۸ غلظت (۲، ۴، ۸، ۱۶، ۳۲، ۶۴، ۱۲۸ و ۲۵۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و ۴ تکرار مورد مطالعه قرار گرفت. در این پژوهش از روش انتشار دیسک برای اندازه‌گیری هاله عدم رشد استفاده شد. حداقل غلظت مهارکنندگی و تعیین حداقل غلظت کشندگی باکتری با محیط کشت مولارهینتون آگار بررسی گردید. نتایج بیانگر این مطلب بود که بیشترین اثر آنتی‌باکتریال در بین باکتری‌های گرم‌مثبت و گرم‌منفی به

ترتیب بر باکتری‌های آنتروکوکوس فکالیس و ایشریشیاکلای در ۲ غلظت ۱۲۸ و ۲۵۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر می‌باشد و اثر کشندگی به صورت افزایشی بود. همچنین بیشترین اثر ضد میکروبی عسل به عنوان شاهد در مقابل باکتری ایشریاکلای و سودوموناس آئروژنز (19mm) مشاهده گردید.

کلمات کلیدی: ایشریشیاکلای، آنتروکوکوس فکالیس، قارچ کامبوجا، عسل

مقدمه

امروزه به دلیل آگاهی متخصصین و افراد از مضرات و عوارض داروها و نگهدارنده‌های شیمیایی توجه به ترکیبات طبیعی، گیاهی و میکرواورگانیسم‌های مفید رو به افزایش است و جهان امروز علم و صنعت در حال ارائه این ترکیبات به عنوان جاگزین مناسب در صنایع غذایی و دارویی می‌باشد (Ahn *et al*., 2017; Yue *et al*., 2013). یکی از جدیدترین روش‌ها جهت سلامتی، پیشگیری و بهبود بیماری ها استفاده از متابولیت‌های میکروبی یا میکرواورگانیسم‌های بی‌ضرر می‌باشد. بنابراین در این راستا می‌توان به معرفی کامبوجا پرداخت. این ترکیب یک لایه پلی‌ساکاریدی حاوی تعدادی از مخمرها و باکتری‌های مفید شامل: کاندیدا (*Candida*)، زیگوساکارومایسز (*Zygosaccharomyces*)، پیشیا (*Pichia*)، ساکارومایسز (*Saccharomyces*)، برتانومایسز (*Brettanomyces*)، استوباکتر (*Acetobacter*)، گلوکونوباکتر (*Gluconacetobacter*) و لاکتوباسیلوس (*Lactobacillus*) می‌باشد که از آن یک نوشیدنی تخمیری دارای طعم شیرین با اسیدیته مناسب تولید می‌گردد و استفاده از آن ریشه در طب سنتی چین دارد (Bhattacharya *et al*., 2016; Jayabalan *et al*., 2008; Reva *et al*., 2015; Trovatti *et al*., 2011). خواص پروبیوتیک کامبوجا به دلیل وجود طیف وسیعی از میکرواورگانیسم‌های مفید روده به اثبات رسیده و در صنعت غذا به عنوان جایگزین شیرین کننده‌ها و تولید محصولات فراسودمند و تخمیری به کار رفته است (Abd El-Salam, 2012). علاوه بر این دارای خواص آنتی‌اکسیدان فراوان و ویتامین‌هایی مانند: B۱۲، اسید فولیک، ویتامین K، فسفر و متیونین بوده که در تقویت سیستم ایمنی و پاک‌سازی خون موثر می‌باشد. همچنین ضد دیابت و ضد سرطان بوده و در بهبود عمل گوارشی دارای نقش موثری است (Bhattacharya *et al*., 2016). از طرفی عسل یک عامل ضد میکروبی قدرتمند است و متشکل از ترکیبات مختلف همچون قند، پلی فنول‌ها، آب اکسیژنه، ترکیبات ۱،۲-دی کربنیل می‌باشد علاوه بر این ویتامین ها، اسیدهای آمینه، آنزیم ها و مواد معدنی نیز در عسل وجود دارد که به اثر ضد باکتریایی آن کمک می کنند. اثر هم افزایی این ترکیبات به عسل امکان می دهد در برابر انواع مختلف میکروارگانیسم‌ها از جمله باکتری های مقاوم به چند داروهای قوی موثر باشد و مقاومت آنها را در برابر عوامل ضد میکروبی تعدیل کند. به گونه‌ای که دارای خواص آنتی اکسیدان فراوان است و به عنوان یک درمان سنتی در عفونت های باکتریایی، سرماخوردگی و سرفه و بیماری های عفونی مختلف استفاده می شود (Alma-saudi *et al*., 2020). اقسام مختلف باکتری‌های گرم‌مثبت و گرم‌منفی باعث ایجاد مسمومیت غذایی، عفونت پوستی و بیماری‌های عفونی گوناگون می‌گردند. از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به سودوموناس آئروژنز (*Pseudomonas aeruginos*)، ایشریشیاکلای (*Escherichia coli*)، استافیلوکوکوس اورئوس (*Staphylococcus aureus*) و آنتروکوکوس فکالیس (*Enterococcus faecalis*) اشاره کرد که در محدوده وسیعی از pH رشد کرده و می‌توانند ایجاد مشکل نمایند. باکتری سودوموناس آئروژنز از دسته میکرواورگانیسم‌های آلوده کننده فرآورده گوشتی بوده که در دمای یخچال رشد می‌کند و از غذای آلوده وارد بدن شده و ایجاد بیماری می‌نماید (Bassetti *et al*., 2018). باکتری ایشریشیاکلای نیز به طور شایع در روده انسان و جانوران وجود داشته که سروتیپ‌های مختلف دارد و سبب ایجاد مسمومیت غذایی، اسهال و بیماری-های عفونی می‌گردد (Manges *et al*., 2019). در بین باکتری‌های نام برده استافیلوکوکوس اورئوس بسیار وسیع‌الطیف است چراکه این کوکسی گرم‌مثبت و بی هوازی اختیاری موفق‌ترین باکتری بیماریزاست و در صورت حضور در بدن شخص ناقل به مواد غذایی راه یافته و در صورت رشد و رسیدن به حد نصاب همراه با باکتری آنتروکوکوس فکالیس که از اقسام باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک می‌باشد و دیگر میکرواورگانیسم‌ها می‌تواند باعث ایجاد بیماری و مسمومیت گردد (Beganovic *et al*., 2018; Gao *et al*., 2018). بنابراین با توجه به ویژگی‌های منحصر به فرد کامبوجا، هزینه ناچیز و طرز تهیه آسان آن به عنوان یک محصول پروبیوتیک و ترکیب آن با عسل به دلیل خواص اثبات شده موثر در بهبود بیماری‌ها و عوامل عفونی هدف از این مطالعه بررسی اثر آنتی‌باکتریال ترکیب فراسودمند قارچ کامبوجا و عسل بر چهارگونه از میکرواورگانیسم‌های بیماری‌زا (سودوموناس، ایشریشیاکلای و استافیلوکوکوس اورئوس، آنتروکوکوس فکالیس) می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه ترکیب کامبوجا با عسل و تعیین غلظت‌ها

قارچ کامبوجای مورد استفاده در این مطالعه از بازار طب سنتی کرمانشاه خریداری گردید. سپس یک لایه کامبوجا به وسیله مخلوط کن کاملا یکنواخت شد و به نسبت ۱ به ۵ به عسل گل‌های بهاری تهیه شده از شهر کرمانشاه اضافه گردید. ترکیب حاصل در یخچال نگهداری شد و در نهایت به مقدار مورد نیاز جهت تهیه غلظت‌های ۲، ۴، ۸، ۱۶، ۳۲، ۶۴، ۱۲۸ و ۲۵۶ میلی گرم بر میلی‌لیتر و تست‌های ضد میکروبی مورد استفاده قرار گرفت.

فعالسازی باکتری و انجام آنالیز انتشار دیسک

سوش باکتریایی مورد استفاده در این پژوهش از انستیتوی پاستور ایران تهیه گردیده و شامل ۴ گونه باکتری‌های اشریشیاکلای (ATCC No. 25922)، آنتروکوکوس‌فکالیس (ATCC No. 19433)، سودوموناس آئروژنوزا (ATCC No. 27853)، استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC No. 25923) می‌باشد که به منظور تعیین فعالیت آن‌ها از کشت روی محیط کشت مولار هینتون آگار در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در ۲۴ ساعت استفاده گردید. آزمون انتشار دیسک در ۴ تکرار برای هریک از غلظت‌های مذکور انجام شد. به این صورت که یک لوب از سوش‌های باکتری روی محیط نوترین آگار کشت داده شده و پس از آغشته نمودن دیسک‌ها به غلظت‌های تهیه شده در شرایط کاملا استریل روی محیط کشت قرار داده شد. در آخر قطر هاله عدم رشد پس از کرمخانه گذاری در ۳۷ درجه سانتیگراد طی ۲۴ ساعت اندازه‌گیری گردید (Biscola *et al*., 2013). در این روش از رقیق کننده DMSO به عنوان کنترل منفی و آنتی‌بیوتیک کلروتتراسایکلین (Chlortetracycline) و جنتامایسین (Gentamicin) به ترتیب برای باکتری‌های گرم‌مثبت و گرم‌منفی جهت کنترل مثبت استفاده گردید.

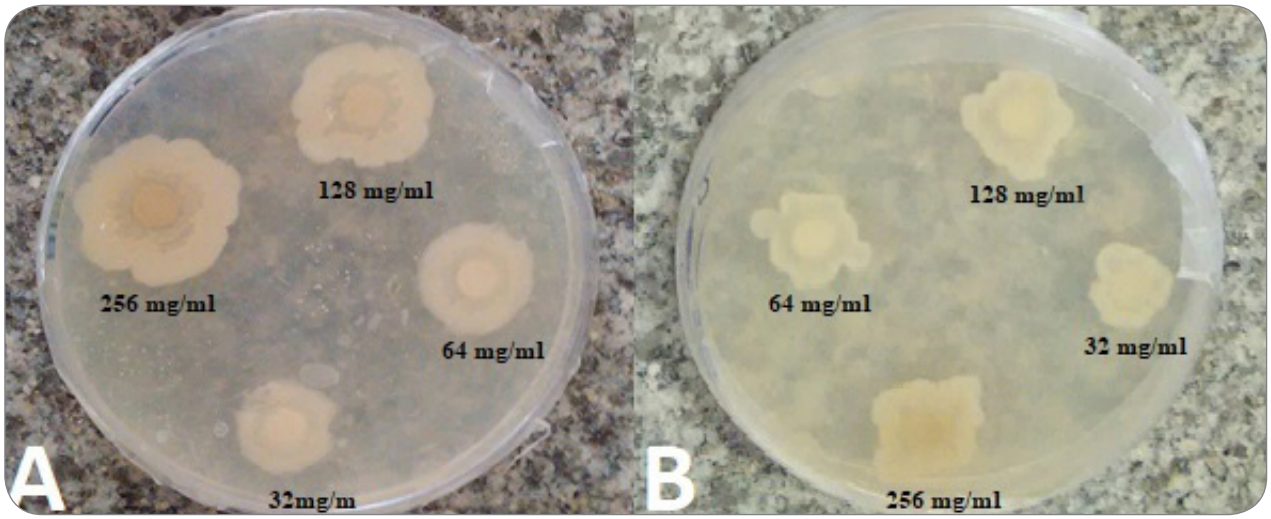
همچنین در این مطالعه اثر آنتی‌باکتریال عسل (در غلظت‌های ۲، ۴، ۸، ۱۶، ۳۲، ۶۴، ۱۲۸ و ۲۵۶ میلی گرم بر میلی‌لیتر) به عنوان شاهد در نظر گرفته شد.

حداقل رقت ممانعت کننده (MIC) و حداقل غلظت کشنده (MBC)

از لوله حاوی ۲ برابر رقت که ۵۰ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی به آن اضافه شده برای تعیین MIC استفاده می‌گردد. در این آزمایش لوله بدون عصاره و بدون محیط کشت به ترتیب جهت کنترل منفی و مثبت در نظر گرفته می‌شود که نبود کدورت در لوله‌ها پس از انکوباسیون در ۲۴ ساعت و در ۳۷ درجه سانتیگراد بیانگر عدم رشد بود. همچنین عدم رشد به عنوان حداقل رقت ممانعت کننده (MIC) معرفی گردید. از دو لوله با رقت کمتر از کمترین غلظت ممانعت کننده و با استفاده از محیط کشت مولارهینتون آگار و مشاهده عدم رشد میکروب در پلیت حداقل غلظت کشندگی مشاهده گردید (Rodríguez-Melcón *et al*., 2019). لازم به ذکر است که تهیه نمودارها و مقایسه میزان کشندگی با استفاده EXL انجام گرفت.

نتایج

در این پژوهش اثر ضد باکتریایی لایه قارچی کامبوجای ترکیب شده با عسل به عنوان یک ترکیب سلامت بخش بر تعدادی از باکتری‌های مهم بیماریزای گرم‌مثبت (انتروکوکوس فکالیس و استافیلوکوکوس اورئوس) و گرم‌منفی (اشریشیاکلای و سودوموناس آئروژنوزا) در ۸ غلظت (۲، ۴، ۸، ۱۶، ۳۲، ۶۴، ۱۲۸ و ۲۵۶ میلی گرم بر میلی‌لیتر) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که هاله عدم رشد در تمامی کشت‌های باکتری‌های در غلظت بالاتر از ۱۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مشاهده گردید و اثر ضد باکتریایی به صورت افزایشی بود (شکل ۱).



شکل۱: (A) هاله عدم رشد غلظت‌های تهیه شده از ترکیب قارچ کامبوجا در عسل بر باکتری آنتروکوکوس فکالیس به‌عنوان یک باکتری گرم‌مثبت (B) هاله عدم رشد غلظت‌های تهیه شده از ترکیب قارچ کامبوجا در عسل بر باکتری ایشریشیاکلای به‌عنوان یک باکتری گرم‌منفی

اثر ضد میکروبی عسل

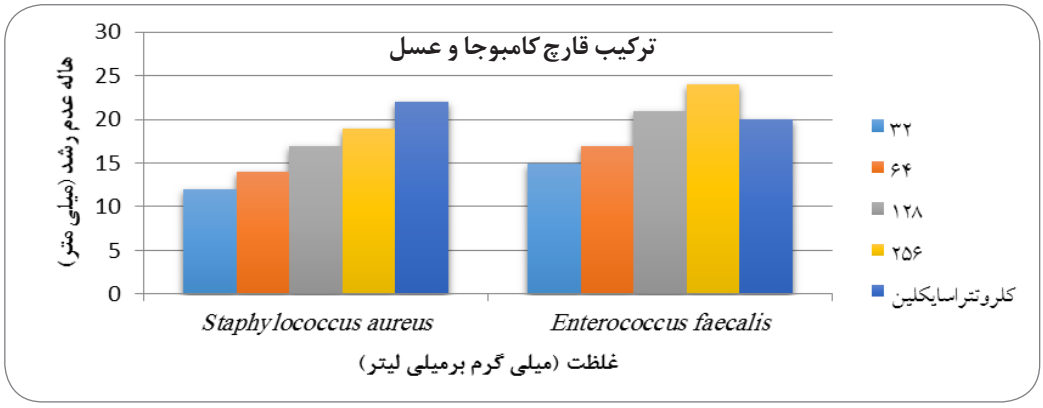
خواص ضد میکروبی عسل در به عنوان نمونه شاهد بررسی گردید. نتایج حاصل نشان داد اثر ضد میکروبی برای همه باکتری‌های گرم‌مثبت (آنتروکوکوس فکالیس و استافیلوکوکوس اورئوس) و گرم‌منفی (سودوموناس آئروژنز و ایشریشیاکلای) به صورت افزایشی بود. در بین باکتری‌های گرم مثبت بیشترین هاله عدم رشد در غلظت ۲۵۶ میلی گرم بر میلی‌لیتر و در باکتری آنتروکوکوس فکالیس (mm19) مشاهده شد. در بین باکتری‌های گرم‌منفی بیشترین هاله عدم رشد مربوط به باکتری ایشریشیا کلای (mm19) بود. ضمن آن‌که میزان هاله عدم رشد در غلظت ۶۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای ایشریشیاکلای (mm13) بیشتر از باکتری آنتروکوکوس فکالیس (mm12) مشاهده شد و کمترین هاله عدم رشد مربوط به باکتری سودوموناس آئروژنز در غلظت ۳۲ میلی‌گرم بر میلی لیتر بود. نتایج آزمون میزان غلظت مهارکنندگی (MIC) و کشندگی (MBC) نشان داد که بیشترین غلظت مهارکنندگی و کشندگی برای باکتری‌های آنتروکوکوس فکالیس و ایشریشیاکلای به صورت مشابه است و به ترتیب در غلظت ۳۲ و ۶۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر دیده شد. همچنین برای دو باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژنز میزان حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی به ترتیب در لوله‌های با غلظت ۶۴ و ۱۲۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر وجود داشت (جدول ۱).

جدول ۱- میزان هاله عدم رشد، حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) عسل در غلظت‌های مورد بررسی

عسل (mg/mL)	*Escherichia coli*	*Pseudomonas aeruginosa*	*Staphylococcus aureus*	*Enterococcus faecalis*
32	11	7	10	11
64	13	9	11	12
128	15	10	14	15
256	19	15	17	19
MIC	32	64	64	32
MBC	64	128	128	64

اثر ضد میکروبی ترکیب کامبوجا و عسل بر باکتری گرم مثبت

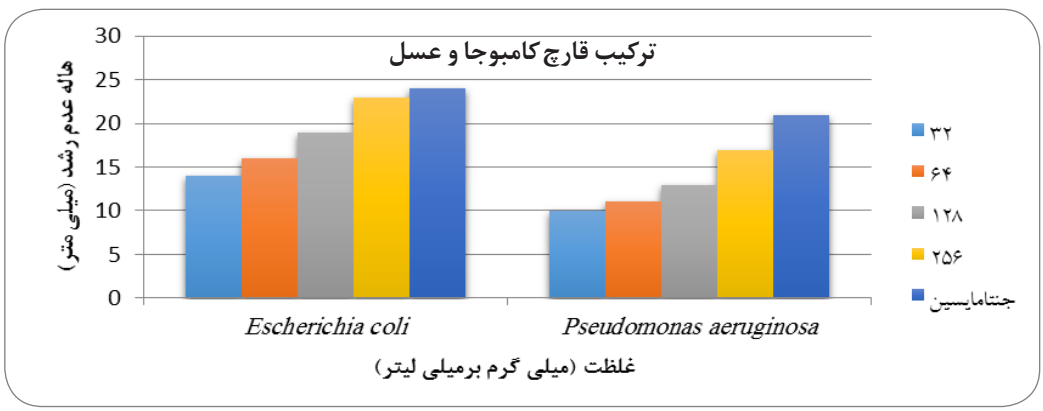
در مطالعه حاضر اثر ضدباکتری ترکیب فراسودمندکامبوجا در عسل بر باکتری‌های گرم‌مثبت از آنتی‌بیوتیک کلروتتراسایکلین به عنوان استاندارد استفاده شد. نتایج بیانگر اثر کشندگی در غلظت‌های ۳۲، ۶۴، ۱۲۸ و ۲۵۶ میلی گرم بر میلی‌لیتر بر هر دو نوع باکتری بود. به طوری‌که هاله عدم رشد در غلظت‌های ۲۵۶، ۱۲۸، ۶۴، ۳۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای آنتروکوکوس فکالیس به ترتیب ۲۴، ۲۱، ۱۷، ۱۵ و استافیلوکوکوس اورئوس ۱۹، ۱۷، ۱۴، ۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد. نکته جالب توجه اثر کشندگی فراوان ترکیب مورد بررسی بر باکتری آنتروکوکوس فکالیس در غلظت ۲۵۶ و ۱۲۸ میلی گرم بر میلی‌لیتر می‌باشد. چراکه میزان هاله عدم رشد (۲۴ mm) در این دو غلظت بیشتر از آنتی‌بیوتیک استاندارد کلروتتراسایکلین (۲۰ mm) بود و هاله عدم رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس نیز با اختلاف کم (۱۹ mm) در غلظت ۲۵۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از انتی‌بیوتیک استاندارد (۲۲ mm) پایین‌تر بود (شکل ۲).



شکل ۲- هاله عدم رشدترکیب قارچ کامبوجا و عسل بر باکتری های گرم مثبت

اثر ضد میکروبی ترکیب قارچ کامبوجا و عسل بر باکتری گرم‌منفی

در مقایسه دو باکتری گرم‌منفی اشریشیاکلای و سودوموناس آئروژنوزا در غلظت‌های ۲۵۶، ۱۲۸، ۶۴، ۳۲ میلی گرم بر میلی‌لیتر، بیشترین هاله عدم رشد بر باکتری ایشریشیاکلای و در غلظت ۲۵۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به میزان mm23 مشاهده گردید که دارای تفاوت اندک با هاله عدم رشد آنتی‌بیوتیک استاندارد جنتامایسین (mm24) بود. این در حالی است که هاله عدم رشد باکتری سودوموناس آئروژنز نیز همانند ایشریشیاکلای در تمامی غلظت‌ها پایین‌تر از استاندارد بود (شکل ۳). نتایج حداقل غلظت مهارکننده (MIC) و کشنده (MBC) بیان نمود که غلظت‌های تهیه شده از ترکیب کامبوجا و عسل در محدوده ۳۲ تا ۶۴ دارای اثر کشندگی بر تمامی باکتری‌ها بود.



شکل ۳- هاله عدم رشدترکیب قارچ کامبوجا و عسل بر باکتری های گرم منفی

بحث و نتیجه‌گیری

کامبوجا به صورت یک لایه از مخمرها و باکتری‌های مفید بوده که به عنوان نوشیدنی زنده همراه با چای سبز و سیاه مورد استفاده قرار گرفته و از دیرباز به دلیل خواص منحصر به فرد خود در طب سنتی شرقی جایگاهی ویژه داشته است. مارش و همکاران (۲۰۱۴) در مطالعه تعین باکتری‌ها و قارچ‌های کامبوجا عنوان نمودند که جنس عمده این باکتری‌ها متعلق به گلوکونو باکتر (*Gluconacetobacter*,) می‌باشد که ۸۵٪ از جمعیت کل باکتری‌ها را تشکیل می‌دهد و حدود ۳۰٪ جمعیت باکتری‌ها نیز لاکتوباسیلوس‌ها (*lactobacillus*,) هستند. همچنین مشخص گردید که بیش از ۹۵٪ از مخمرهای موجود زیگوساکارومایسز است (Marsh,*et al* 2014). عوامل ضد میکروبی در کاهش و درمان بیماری‌های عفونی بسیار موثر هستند اما همچنان مقاومت پاتوژن‌های مختلف در برابر آنتی بیوتیک‌ها در حال افزایش است که باعث توجه به روش‌های ضد میکروبی جایگزین و استفاده از داروهای سنتی قدیمی شده است و از جمله آن‌ها می‌توان به عسل اشاره کرد (Levy & Marshall, 2004; Mandal *et al*, 2009). عسل دارای خواص آنتی باکتریال بر باکتری‌های عفونی و عامل فساد مواد غذایی است و برای اهداف تغذیه‌ای و پزشکی مورد استفاده قرار می‌گیرد به طوری که در سال های اخیر یک شاخه جدید از پزشکی بر پایه درمان‌های مبتنی بر عسل و سایر محصولات زنبور عسل به نام اپیتراپی به وجود آمده است (Lusby *et al*, 2005; M. D. Mandal & Mandal, 2011). طبق گزارش مولان و همکاران عنوان شده است که عسل دارای اثر مهاری بر ۶۰گونه از باکتری‌های هوازی، بی هوازی، گرم مثبت و گرم منفی است (Molan, 1992). خواص آنتی‌باکتریال اثر در برابر گرما و pH پایدار است و بیان شده است که سطح pH و قند بالا در جلوگیری از رشد میکرواورگانیسم‌ها موثر است (M. D. Mandal & Mandal, 2011). عسل به دلیل نقش ضدالتهاب، ضد انگل، سرکوب کننده سیستم ایمنی، نقش درمانی در سوختگی، زخم-های مزمن، بیماری‌های چشمی، آسم، اختلالات گوارشی، ضد سرطان، ضد جهش و محافظت از کبد بسیار مورد توجه است. اثربخشی و قدرت عسل در برابر میکروارگانیسم‌ها به نوع عسل تولید شده بستگی دارد که منوط به منشاگیاهی، سلامت زنبور عسل ، منشا و روش فرآوری آن است (Tonks *et al*., 2003). عسل توسط زنبورهایی تولید می شود که شهد را به عنوان ماده اولیه گل ها جمع آوری و ذخیره می کنند. در اصل عسل یک محلول آبی غلیظ قند است و عمدتا از قندهای گلوکز ساکارز و فروکتوز تشکیل شده است که ۸۰٪ از وزن آن را تشکیل می دهند و ۲۰٪باقیمانده آب را تشکیل می دهد. ترکیبات و خواص تغذیه‌ای عسل از گیاهان نشأت می‌گیرد مانند پروتئین‌ها، اسیدهای آمینه که ۵۰-۸۰٪آن‌ها را پرولین تشکیل می‌دهد. از دیگر ترکیبات عسل می‌توان به ترکیبات فلاوونوئدی (فلاون ، فلاونول ، فلاونون ، و دی هیدروفلاونولول ها)، سینامیک) اسیدها و استرهای آنها) ، پپتیدهای متیل گلیوکسال، ویتامین ها و آنزیم‌های مختلف مانند گلوکزاکسیداز، گلوکوزیداز، دیاستاز و کاتالاز اشاره کرد. عنوان گردیده است که ترکیبات هیدروپروکسید موجود در عسل یکی از عوامل ضد میکروبی آن است (Cebrero *et al*., 2020; Ghramh *et al*., 2019). اثربخشی و قدرت عسل در برابر میکروارگانیسم ها به نوع عسل تولید شده بستگی دارد که منوط به منشاگیاهی، سلامت زنبور عسل ، منشا و روش فرآوری آن است (Tonks *et al*., 2003). اثر ضد میکروبی عسل به عنوان نمونه شاهد بر تمامی میکرواورگانیسم‌ها (آنتروکوکوس فکالیس، استافیلوکوکوس اورئوس، ایشریشیاکلای و سودوموناس آئروژنز) در تمامی غلظت‌ها (۳۲، ۶۴، ۱۲۸ و ۲۵۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) مشاهده شد. میزان قابل توجهی از هاله عدم رشد ترکیب کامبوجا و عسل مربوط به عسل بود اما میزان هاله در نمونه عسل نسبت به ترکیب شده آن با قارچ کامبوجا برای تمامی باکتری‌ها پایین‌تر بود، به طوری که می‌تواند ترکیب قارچ کامبوجا و عسل را به صورت فراسودمند در نظر گرفت و در جهت بهبود خاصیت اثر بخش عسل از آن استفاده نمود. ضمن آنکه نوع تاثیر ترکیب قارچ کامبوجا و عسل اندکی متفاوت‌تر از خواص آنتی‌باکتریال عسل به تنهایی بود. چراکه بیشترین خواص عسل بر باکتری ایشریشیاکلای و آنتروکوکوس فکالیس مشاهده شد اما اثر ضد باکتری ترکیب عسل و قارچ کامبوجا به ترتیب در باکتری‌های گرم‌مثبت آنتروکوکوس فکالیس و استافیلوکوکوس اورئوس بیشتر بود. زینال و همکاران در سال ۲۰۱۳ خواص ضد میکروبی چند نوع عسل کشور مالزی را بر باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، سودوموناس آئروژنز و ایشریشیاکلای بررسی کردند. نتایج مشخص کرد که عسل آناناس بیشتر بر باکتری‌های گرم‌منفی ایشریشیاکلای و سودوموناس آئروژنز موثر است. در حالی که عسل اقاقیا بیشتر بر باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس موثر بود. همچنین عنوان گردید که در مجموع میزان عدم رشد در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بیشتر بود (Zainol, *et al* 2013). در این پژوهش اثر ضد باکتری ترکیب پروبیوتیک

کامبوجا و عسل بر باکتری‌های انتروکوکوس فکالیس، استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیاکلای و سودوموناس آئروژنوزا بیانگر هاله عدم رشد در غلظت‌های بالاتر از ۳۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. باتیخ و همکاران در سال ۲۰۱۲ از ترکیب چای سیاه و دوگیاه دارویی در تهیه نوشیدنی کامبوجا استفاده نموده و پس از ارزیابی فعالیت ضد باکتریایی و ضد قارچی نتایج رضایت بخش مشاهده گردید. توجیه نویسنده این بود که اثر ضد باکتریایی کامبوجا نه تنها به دلیل اسیدیته ناشی از وجود اسید استیک و سایر اسیدهای آلی است بلکه به دلیل وجود ترکیبات بیولوژیکی دیگر از جمله پروتئین‌ها، آنتی‌بیوتیک‌ها، آنزیم‌ها و انواع دیگر متابولیت‌های بیوسنتز می‌باشد (Battikh *et al*., 2012). میزان اثر کشندگی ترکیب کامبوجا و عسل بر باکتری‌های انتروکوکوس فکالیس و استافیلوکوکوس اورئوس در تمامی غلظت‌ها مشاهده شد. به طوری که میزان اثر کشندگی به صورت افزایشی بوده و بر باکتری انتروکوکوس فکالیس بیشتر بود. شاملو و همکاران در سال ۲۰۲۰ اثر ترکیب هیدرو ژل عسل، کیتوزان و پلی ونیل الکل را بر ترمیم میکرواورگانیسم‌های زخم بررسی کردند به طوری که نتایج بیانگر اثر افزایشی غلظت اثر بر این میکرواورگانیسم‌ها بود (Shamloo *et al*., 2020). همچنین هاله عدم رشد باکتری در دو غلظت بالاتر (۲۵۶ و ۱۲۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) برای باکتری انتروکوکوس فکالیس بیشتر از استاندارد (کلروتتراسایکلین) مشاهده شد. در مطالعه‌ای که توسط تو و همکاران در سال ۲۰۱۹ انجام شد اثر ضد باکتریایی پروتئین سویای تخمیر شده با کامبوجا در مقایسه با اثر ضدباکتریایی اسید استیک بر سه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس، ایشریشیاکلای و باسیلوس سوبتیلیس مطالعه گردید. نتایج میزان کشندگی بیشتر ترکیب سویای تخمیرشده با کامبوجا را به اثبات رسانید و عنوان گردید که اسیداستیک تولید شده به تنهایی مسئول فعالیت ضد باکتریایی نیست (Tu *et al*., 2019). بر طبق مطالعه پالوس و همکاران در سال ۲۰۱۰ که به بررسی اثر آنتی باکتریال عسل بر میکرواورگانیسم‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها انجام شد مشخص گردید که تمامی گونه‌های میکرواورگانیسم‌های مورد پژوهش شامل: باسیلوس سوبتیلیس و استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم در برابر متی سیلین، ایشریشیاکلای و سودوموناس آئروژنز مقاوم در برابر فلوکساسین و همچنین باکتری آنتروکوکوس فاسیوم توسط ۱۰ تا ۲۰ درصد عسل کشته شدند (Kwakman *et al*., 2010). در بررسی میزان کشندگی ترکیب کامبوجا و عسل بر دو باکتری گرم‌منفی بیشترین هاله عدم رشد در باکتری ایشریشیاکلای و در بالاترین غلظت مشاهده گرد. به طوری هاله عدم رشد در این غلظت نزدیک به هاله عدم رشد استاندارد بود. اما میزان هاله عدم رشد در باکتری سودوموناس آئروژنز پایین‌تر از باکتری ایشریشیاکلای در تمامی غلظت‌ها بود. زوبیدا و همکاران در سال ۲۰۱۸ اثر ضد باکتریایی آب‌میوه‌های حاوی کامبوجا را بر باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و ایشریشیاکلای مورد بررسی قرار دادند و نتایج بیانگر این مطلب بود که میزان کشندگی و هاله عدم رشد با افزایش تولید اسید آلی و با گذشت زمان افزایش یافت (Zubaidah *et al*., 2018). همچنین اثر کشندگی بر همه باکتری‌های مورد بررسی به وسیله نتایج حداقل غلظت مهارکننده (MIC) و کشنده (MBC) به اثبات رسید. باتچاریا و همکاران در سال ۲۰۱۶ فعالیت ضد میکروبی نوشابه‌های تخمیر شده حاصل از ترکیب با گیاه بومادران بر باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس (*S. aureus*)، کلبسیلا پنومونیه (*Klebsiella pneumoniae*)، ایشریشیا کلای (*E. coli*)، پروتئوس (*Proteus vulgaris*)، سودوموناس (*P. mirabilis*)، باسیلوس سوبتیلیس (*B. subtilis*) و ۲ مخمر کاندیدا آلبیکنز (*C.albicans*) و آسپرژیلوس نایجر (*Aspergillus niger*) بررسی گردید. در ادامه این پژوهش مشخص گردید که تمام نوشیدنی‌های تولید شده دارای فعالیت ضد میکروبی بودند. MIC و MBC در حد ۹/۷۶ تا ۳۱۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد و فعالیت ضد میکروبی خوب در مقایسه با مطالعات دیگر را نشان داد (Bhattacharya *et al*., 2011). MIC زیر ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بیانگر فعالیت خوب و بین ۱۰۰ تا ۵۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نشان دهنده فعالیت متوسط است (Holetz *et al*., 2002). همچنین در مطالعات گذشته به وجود ترکیبات فلاوونوئیدی و فنولیک به عنوان عوامل ضد میکروبی قوی موجود در کامبوجا اشاره گردیده است که با افزایش زمان تخمیر میزان آن‌ها افزایش می‌یابد (Chakravorty *et al*., 2016). در پژوهشی توسط میزوتا و همکاران در سال ۲۰۲۰ برای بررسی اثر آنتی‌باکتریال کامبوجا در برابر باکتری آسیکلوباسیلوس (*Alicyclobacillus* spp) انجام گرفت. در این مطالعه فعالیت چای سبز تخمیر شده با عصاره کامبوجا مورد آزمایش قرار گرفت و پس از انجام آزمون به روش MIC و MBC مشخص گردید که غلظت مهارکننده و حداقل غلظت ضد باکتری در محدوده ۵/۱۲٪ تا ۵۰٪ برای تمام گونه‌ها مشاهده گردید. همچنین با استفاده از تجزیه و تحلیل DPPH، FRAP و ABTS فعالیت آنتی‌اکسیدانی به اثبات رسیده است (Mizuta *et al*., 2020). به طور کلی و در غلظت‌های عنوان شده نتایج بیانگر اثر کشندگی ترکیب تهیه شده از قارچ کامبوجا

و عسل بر تمامی باکتری‌های مورد مطالعه سودوموناس آئروژنز، استافیلوکوکوس اورئوس و ایشریشیاکلای، آنتروکوکوس فکالیس) و در همه غلظت‌ها (۲، ۴، ۸، ۱۶، ۳۲، ۶۴، ۱۲۸ و ۲۵۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) بود و این اثر بر باکتری‌های گرم مثبت خصوصا باکتری انتروکوکوس فکالیس بیشتر مشاهده گردید.

بنابراین با توجه به اثر قابل ملاحظه ترکیب حاصل در از بین بردن میکرواورگانیسم‌های نام برده می‌تواند به عنوان ترکیبی طبیعی مورد توجه محققان و کاربران قرار گیرد و به عنوان ترکیبی طبیعی و پروبیوتیک در درمان عفونت و بیماری، سلامت بخشی استفاده گردد.

منبع ها:

Abd El-Salam, S. S. 2012. 16S rRNA gene sequence detection of acetic acid bacteria isolated from tea Kombucha. New York Science Journal, 5(3): 55-61.

Ahn, H., Kim, J., & Kim, W. J. 2017. Isolation and characterization of bacteriocin-producing Pediococcus acidilactici HW01 from malt and its potential to control beer spoilage lactic acid bacteria. Food Control, 80: 59-66.

Almasaudi, S. 2020. The Antibacterial Activities of Honey. Saudi Journal of Biological Sciences.

AmirShamloo. 2020. Fabrication and evaluation of Chitosan/Gelatin/PVA hydrogel incorporating Honey for wound healing applications: An In Vitro, In Vivo Study. International Journal of Pharmaceutics: 120068.

Bassetti, M., Vena, A., Croxatto, A., Righi, E., & Guery, B. 2018. How to manage Pseudomonas aeruginosa infections. Drugs in context: 7.

Battikh, H., Bakhrouf, A., & Ammar, E. 2012. Antimicrobial effect of Kombucha analogues. LWT-Food Science and Technology, 47(1): 71-77.

Beganovic, M., Luther, M. K., Rice, L. B., Arias, C. A., Rybak, M. J., & LaPlante, K. L. 2018. A review of combination antimicrobial therapy for Enterococcus faecalis bloodstream infections and infective endocarditis. Clinical Infectious Diseases, 67(2): 303-309.

Bhattacharya, D., Bhattacharya, S., Patra, M. M., Chakravorty, S., Sarkar, S., Chakraborty, W., Gachhui, R. 2016. Antibacterial activity of polyphenolic fraction of kombucha against enteric bacterial pathogens. Current Microbiology, 73(6): 885-896.

Bhattacharya, S., Gachhui, R., & Sil, P. C. 2011. Hepatoprotective properties of kombucha tea against TB-HP-induced oxidative stress via suppression of mitochondria dependent apoptosis. Pathophysiology, 18(3): 221-234.

Biscola, V., Todorov, S. D., Capuano, V., Abriouel, H., Gálvez, A., & Franco, B. 2013. Isolation and characterization of a nisin-like bacteriocin produced by a Lactococcus lactis strain isolated from charqui, a Brazilian fermented, salted and dried meat product. Meat Science, 93(3):607-613.

Chakravorty, S., Bhattacharya, S., Chatzinotas, A., Chakraborty, W., Bhattacharya, D., & Gachhui, R. 2016. Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics. International Journal of Food Microbiology, 220: 63-72.

Cebrero, G., Sanhueza, O., Pezoa, M., Báez, M. E., Martínez, J., Báez, M., & Fuentes, E. 2020. Relationship among the minor constituents, antibacterial activity and geographical origin of honey: A multifactor perspective. Food Chemistry, 315: 126296.

Gao, C., Fan, Y.-L., Zhao, F., Ren, Q.-C., Wu, X., Chang, L., & Gao, F. 2018. Quinolone derivatives and their activities against methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA). European Journal of Medicinal Chemistry, 157: 1081-1095.

Ghramh, H. A., Khan, K. A., & Alshehri, A. M. A. 2019. Antibacterial potential of some Saudi honeys from Asir region against selected pathogenic bacteria. Saudi Journal of Biological Sciences, 26(6): 1278-1284

Holetz, F. B., Pessini, G. L., Sanches, N. R., Cortez, D. A. G., Nakamura, C. V., & Dias Filho, B. P. 2002. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 97(7): 1027-1031.

Jayabalan, R., Marimuthu, S., Thangaraj, P., Sathishkumar, M., Binupriya, A. R., Swaminathan, K., & Yun, S. E. 2008. Preservation of Kombucha Tea□ Effect of Temperature on Tea Components and Free Radical Scavenging Properties. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56(19): 9064-9071.

Kwakman, P. H., Velde, A. A. t., de Boer, L., Speijer, D., Christina Vandenbroucke□Grauls, M., & Zaat, S. A. 2010. How honey kills bacteria. The FASEB Journal, 24(7): 2576-2582.

Levy, S. B., & Marshall, B. 2004. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. Nature medicine, 10(12): S122-S129.

Lusby, P. E., Coombes, A. L., & Wilkinson, J. M. 2005. Bactericidal activity of different honeys against pathogenic bacteria. Archives of medical research, 36(5): 464-467.

Manges, A. R., Geum, H. M., Guo, A., Edens, T. J., Fibke, C. D., & Pitout, J. D. 2019. Global extraintestinal pathogenic Escherichia coli (ExPEC) lineages. Clinical Microbiology reviews, 32(3).

Marsh, A. J., O'Sullivan, O., Hill, C., Ross, R. P., & Cotter, P. D. 2014. Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple kombucha (tea fungus) samples. Food Microbiology, 38 :171-178.

Mizuta, A. G., de Menezes, J. L., Dutra, T. V., Ferreira, T. V., Castro, J. C., da Silva, C. A. J., . . . de Abreu Filho, B. A. 2020. Evaluation of antimicrobial activity of green tea kombucha at two fermentation time points against Alicyclobacillus spp. LWT: 109641.

Molan, P. C. 1992. The antibacterial activity of honey: 1. The nature of the antibacterial activity. Bee world, 73(1): 5-28.

Mandal, S., Pal, N. K., Chowdhury, I. H., & Debmandal, M. 2009. Antibacterial activity of ciprofloxacin and trimethoprim, alone and in combination, against Vibrio cholerae O 1 Biotype El Tor serotype Ogawa isolates. Polish journal of microbiology, 58(1): 57-60.

Reva, O. N., Zaets, I. E., Ovcharenko, L. P., Kukharenko, O. E., Shpylova, S. P., Podolich, O. V., Kozyrovska, N. O. 2015. Metabarcoding of the kombucha microbial community grown in different microenvironments. AMB Express, 5(1): 1-8.

Rodríguez-Melcón, C., Riesco-Peláez, F., García-Fernández, C., Alonso-Calleja, C., & Capita, R. 2019. Susceptibility of Listeria monocytogenes planktonic cultures and biofilms to sodium hypochlorite and benzalkonium chloride. Food Microbiology, 82: 533-540.

Tonks, A. J., Cooper, R., Jones, K., Blair, S., Parton, J., & Tonks, A. 2003. Honey stimulates inflammatory cytokine production from monocytes. Cytokine, 21(5): 242-247.

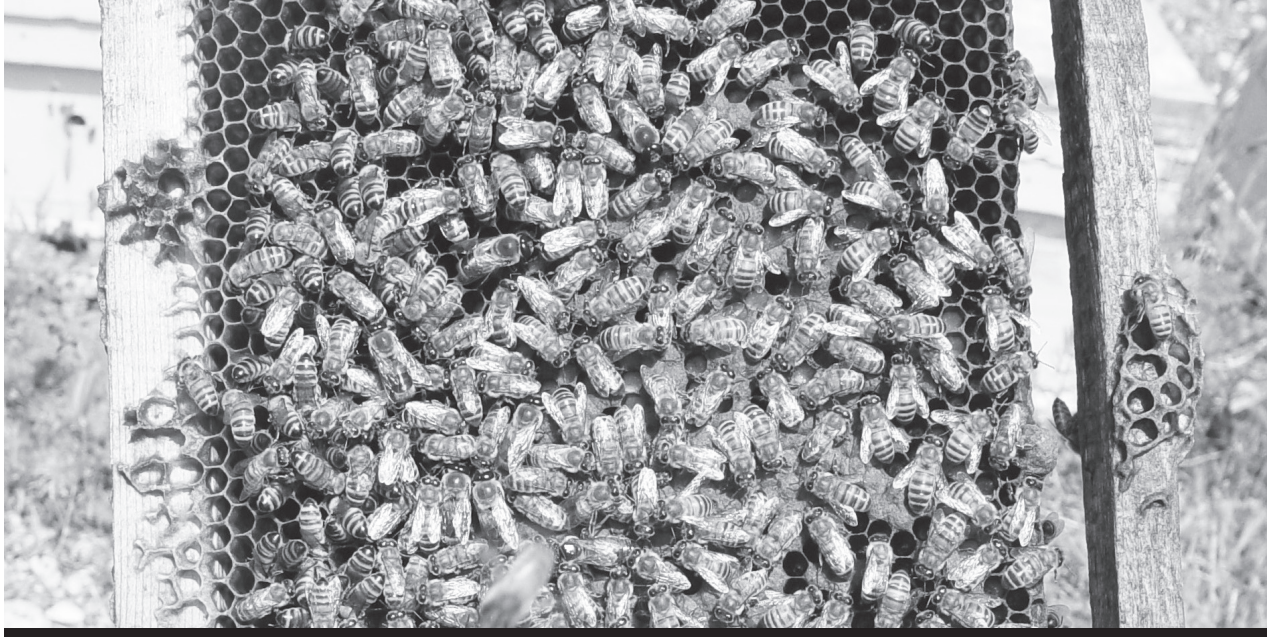
Trovatti, E., Serafim, L. S., Freire, C. S., Silvestre, A. J., & Neto, C. P. 2011. Gluconacetobacter sacchari: an efficient bacterial cellulose cell-factory. Carbohydrate Polymers, 86(3): 1417-1420.

Tu, C., Tang, S., Azi, F., Hu, W., & Dong, M. 2019. Use of kombucha consortium to transform soy whey into a novel functional beverage. Journal of Functional foods, 52: 81-89.

Yue, T., Pei, J., & Yuan, Y. 2013. Purification and characterization of anti-Alicyclobacillus bacteriocin produced by Lactobacillus rhamnosus. Journal of Food Protection, 76(9): 1575-1581.

Zainol, M. I., Yusoff, K. M., & Yusof, M. Y. M. 2013. Antibacterial activity of selected Malaysian honey. BMC complementary and alternative medicine, 13(1) :1-10.

Zubaidah, E., Dewantari, F. J., Novitasari, F. R., Srianta, I., & Blanc, P. J. 2018. Potential of snake fruit (Salacca zalacca (Gaerth.) Voss) for the development of a beverage through fermentation with the Kombucha consortium. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 13: 198-203.



Evaluation of the antibacterial effect of a beneficial compound based on the probiotic kombucha and honey

M. Soltani[1], M. Farshadfar[2], H. Shirvani[3], A. Yaghotipoor

1 Department of Food Science and Technology, School of Nutritional Sciences and Food Technology, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

2 Associate Professor, Department of Agriculture, Payame Noor University, Tehran, Iran

3 Instructor of Agriculture Department, Payame Noor University, Tehran, Iran

4 Ph.D in Plant breeding, Department of Agronomy and Plant breeding, Faculty of Science and Agriculture Engineering, Razi University, Kermanshah, Iran

DOI: 10.22092/HBSJ.2021.352603.1095

Abstract

Kombucha is a natural compound in traditional Chinese medicine that has been used for a long time and consists of a number of beneficial bacteria and yeasts that have recently been used in the production of health drinks. Also, honey has been used for a long time and its medicinal and healing properties have been proven in the distant past. In this study, Antibacterial effect of a combination of kombucha and honey in a ratio of 1 to 5 were studied on a number of food microorganisms)*Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus and Escherichia coli, Enterococcus faecalis*(in 7 concentrations)2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 and 256 mg/ milliliter(and 4 replications. In this study, the disk diffusion method was used to measure the growth zone and the minimum inhibitory growth concentration)MIC(of bacteria without turbidity of the extracts was tested to test the inhibitory growth concentration and determine the minimum lethal concentration)MBC(of bacteria with Muellar Hintone Agar. The results showed that the highest antibacterial effect among gram positive and gram negative bacteria was on*Enterococcus faecalis* and *Escherichia coli* at two concentrations of 128 and 256 mg/ml. In addition, the lethal effect was incremental. Also the highest antimicrobial effect of honey as a control was observed against *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*)19 mm(.

Key words: Escherichia coli, Enterococcus faecali, Kombucha, Honey

Corresponding Author: M. Soltani
Email: mahyasoltani7113@gmail.com