

## مطالعه اثر مهاری چای سیاه و چای سبز (Camellia sinensis) بر رشد باکتری اشريشیاکلی (in vitro) بیماریزا در محیط آزمایشگاه

نیلوفر خلجی<sup>۱</sup>، تیرنگ نیستانی<sup>۲</sup>

۱- کارشناس ارشد میکروبیولوژی پزشکی گروه تحقیقات تغذیه، انتیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشگاه علوم پزشکی شهید

بهشتی

۲- نویسنده مسئول: استادیار پژوهشگر (پژوهشگر) گروه تحقیقات تغذیه، انتیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشگاه علوم پزشکی

شهید بهشتی. پست الکترونیکی: tneyestani@nnftri.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۸۵/۱۱/۲۵

تاریخ دریافت: ۸۵/۸/۱۵

### چکیده

**سابقه و هدف:** اثرات ضدمیکروبی چای سبز در مطالعات گوناگون نشان داده است. اما مطالعات انجام شده روی اثرات مهاری چای سیاه بر رشد باکتری‌ها از جمله اشريشیاکلی (E.coli) نسبتاً کم است. هدف از انجام این مطالعه، ارزیابی اثرات میکروبیولوژیکی چای سیاه و سبز بر رشد باکتری E.coli بیماریزا در آزمایشگاه بود.

**مواد و روشها:** عصاره چای سیاه و سبز (گیاه Camellia sinensis) به روش پرکولاسیون، تهیه و خشک شد. سپس غلظتهاهی مختلف عصاره تهیه شد. باکتری در محیط مایع در معرض عصاره با غلظتهاهی مختلف قرار داده شد. با انتقال روی محیط جامد در زمانهای متفاوت، قابلیت زیست آنها با شمارش پرگنه‌های حاصله ارزیابی شد. در مرحله بعد، اثرات متقابل عصاره‌های چای سیاه و سبز با برخی از رایج‌ترین آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده در عفونتهای گرم منفی به روش آزمون حساسیت باکتریایی (آنتی‌بیوگرام) با دیسک مطالعه شد. آزمون آنتی‌بیوگرام به روش دیسک برای دیسک‌های آغشته به عصاره ۱۱ بار در روزهای مختلف انجام شد. از روی میانگین قطر هاله‌های پرگنه، مهار رشد محاسبه شد. برای آنالیز آماری از آزمونهای ویلکاکسون و کروسکال-والیس استفاده شد.

**یافته‌ها:** عصاره‌های چای سیاه و سبز به طور انتخابی و واپسی به عصاره چای سیاه به طرز معنی داری بالاتر بود. آنتی‌اکسیدانی عصاره چای سبز در مقایسه با عصاره چای سیاه اثرات هم افزاینده یا مهاری داشتند. توان

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد که اثرات مهاری چای مستقیماً به توان آنتی‌اکسیدانی آن مربوط است و پلی‌فنل‌های چای در شرایط خاصی به صورت اکسیدان عمل کرده و از این طریق، اثرات مهاری خود را بر رشد سلولی اعمال می‌کنند. یافته‌های این مطالعه امکان استفاده از مقادیر مناسبی از چای یا مکمل پلی‌فنل‌های حاصل از آن را به عنوان درمان کمکی در بیماران تحت درمان با آنتی‌بیوتیک‌ها مطرح می‌کند.

**واژگان کلیدی:** چای سیاه. چای سبز، اشريشیاکلی، اثر مهاری، توان آنتی‌اکسیدانی

### • مقدمه

خود معطوف کرده است. چای (Camellia sinensis) یکی از پرمصرف‌ترین نوشیدنیها در سراسر جهان و بویژه ایران است که حاوی پلی‌فنل‌هایی نظیر فلاوین و تیرابیجین است. در مطالعه‌ای در سال ۱۹۹۹ مشخص شد که کاتکین‌ها شامل کاتکین، اپی‌گالوکاتکین، اپی‌کاتکین گالات و اپی‌گالوکاتکین موجود در چای سبز، مانع آزاد شدن نوعی زهرا به نام وروتوکسین

استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها، هسته اصلی درمان در عفونتهای باکتریایی را تشکیل می‌دهد، ولی به دلیل افزایش روزافزون مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌ها وجود عوارض جانبی داروها، کاربرد یک روش کمکی برای درمان این عفونتها اهمیت ویژه‌ای پیداکرده است. امروزه، استفاده از عصاره‌های گیاهی برای درمان کمکی عفونتهای میکروبی، توجه بسیاری از پژوهشگران را به

محلول ۲۵۰ mg/ml در دی متیل سولفوکسید (DMSO) تهیه و از آن غلظتهای ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم در میلی لیتر محیط تیوگلیکولات آماده شد.

محیطهای کشت تیوگلیکولات، (EMB) Mueller Hinton Agar ، Eosin Methylen Blue و آگار مغذی (Nutrient Agar) (همگی از کارخانه Merck) به روش مندرج روی بسته بندی تهیه شدند. در کشت E.coli روی محیط EMB، پرگنهای مشخص این باکتری با جلای فلزی خاص و به طور خالص به دست آمد. در آزمون حساسیت باکتریایی در برابر غلظتهای مختلف عصاره چای از دو روش پخش سوسپانسیون باکتری در پلیت (Pour plate) (۵) و دیسک (۶) استفاده شد.

در روش Pour plate ابتدا غلظتهای مختلف عصاره های چای سبز و سیاه در محیط تیوگلیکولات تهیه شد (حجم نهایی ۱۰ ml) سپس ۱ml از سوسپانسیون MacFarland باکتریایی، معادل استاندارد ۰/۵ مک فارلنده (۱×۱۰<sup>۸</sup> CFU/ml) به غلظتهای تهیه شده از عصاره های چای افزوده و در ۳۷°C انکوبه شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت، ۱ml از این لوله ها به پلیت استریل، منتقل و ۱۰ ml از محیط آگار مغذی ذوب شده در ۴۵°C (به پلیت های حاوی E.coli) افزوده شد. پس از پخش یکنواخت باکتری در محیط، همه پلیت ها در ۳۷°C انکوبه شدند و نتایج پس از گذشت ۲۴ ساعت قرائت شد.

برای تهیه دیسک های عصاره چای سیاه و سبز، مقدار ۲۵ ml از غلظتهای ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم در میلی لیتر از سه ماده فوق الذکر به دیسک های بلانک (از شرکت پادتن طب) یا دیسک های آنتی بیوتیک (شرکت پادتن طب) تلقیح شد. دیسک ها به مدت یک ساعت در انکوباتور ۳۷°C گذاشته شدند تا خشک شوند. سپس، اثر دیسک های حاوی عصاره چای سبز و سیاه، به تنها یی با آنتی بیوتیک با دیسک های استاندارد آنتی بیوتیک مقایسه شد. دیسک های آنتی بیوتیک مورد استفاده برای باکتری E.coli عبارت بودند از:

(verotoxin) از اشريشیاکلی انتروهموراژیک و در نتیجه، مهار بیماری ای بین باکتری می شود. این اثر در مورد پلی فنل های گیاهی نیز گزارش شده است (۲، ۱).

همچنین در مطالعه ای در سال ۲۰۰۱ ۲۰۰۱ مشخص شد که اپی گالوکاتکین گالات چای باعث کاهش انتقال پلاسمید بیماری ای Eolic600 بین R222 (دهنده) و (کیرنده) Ecoli k12 می شود (۳).

در پژوهش دیگری اثرات ضد باکتریایی انواع پلی فنل بر چندین گونه باکتری بیماری از جمله E.coli برسی شد، کمترین غلظت مهاری (MIC)<sup>۱</sup> برای E.coli چندین برابر باکتری های دیگر مانند استافیلوکوکوس اورئوس (به ترتیب ۱۵۱۹±۹۴۹ و ۱۹۲±۹۱ میکرو گرم در میلی لیتر) و حتی بیش از سالمونلا (۷۹۵ ±۵۹۰ µg/ml) بود. پژوهشگران چنین نتیجه گرفتند که احتمالاً وجود گروههای ۳، ۴، ۵- تری هیدروکسی فنیل مولکول پلی فنل در خواص ضد میکروبی آن نقش دارد (۴). از آنجا که تا به حال چنین مطالعه ای در ایران صورت نگرفته است، و با توجه به مصرف بالای چای بویژه چای سیاه در کشور ما و شیوع عفونتهای ناشی از E.coli در این مطالعه بر آن شدیم تا اثر مهاری چای سیاه و سبز را روی باکتری Ecoli بررسی نمائیم.

## • مواد و روشها

در این مطالعه تجربی، سویه خالص باکتری انترپاتوژن (ATCC: 25920) از سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. برای تهیه عصاره به روش پرکولاسیون، ۱۰۰ گرم چای (سیاه یا سبز) به یک ارلن مایر، منتقل و ۲ لیتر اتانول ۷۰٪ به آن اضافه شد. پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون در ۴۰°C، عصاره از کاغذ صافی عبور داده شد و تفاله، مراحل قبل تکرار شد. سپس با استفاده از دستگاه تبخیر کننده عصاره، تغییل و حجمش به ۲۰ ml رسانده شد. عصاره تغییل شده با انکوباسیون در ۵۰°C کاملاً خشک و سپس با کاردک ترشیده و در هاون ساییده شد. از عصاره خشک،

<sup>۱</sup>- minimum inhibitory concentration

نتایج روش pour plate فقط از عصاره‌های چای سبز و سیاه در دو غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر استفاده شد.

**جدول ۱- اثر عصاره چای سیاه بر روی تعداد پرگنه‌های E.coli در زمانها و غلظتهای مختلف**

غلظت (mg/mL)					
زمان انکوباسیون (ساعت)					
۱۰۰/۰	۵۰/۰	۲۵/۰	۱۲/۵	۶/۲۵	
-	$10^{-3}$	$<10^{-4}$	$<10^{-5}$	$<10^{-5}$	۱
-	$7 \times 10^{-2}$	$<10^{-4}$	$<10^{-5}$	$<10^{-5}$	۲
-	$10^{-2}$	$<10^{-4}$	$<10^{-5}$	$<10^{-5}$	۳
-	-	$<10^{-4}$	$<10^{-5}$	$<10^{-5}$	۵
-	-	-	$<10^{-5}$	$<10^{-5}$	۷
-	-	-	$<10^{-5}$	$<10^{-5}$	۲۴

**جدول ۲- اثر عصاره چای سبز بر روی تعداد پرگنه‌های E.coli در زمانها و غلظتهای مختلف**

غلظت (mg/mL)					
زمان انکوباسیون (ساعت)					
۱۰۰/۰	۵۰/۰	۲۵/۰	۱۲/۵	۶/۲۵	
-	$8 \times 10^{-3}$	$2 \times 10^{-3}$	$<10^{-4}$	$<10^{-5}$	۱
-	۵۰	$5 \times 10^{-2}$	$<10^{-4}$	$<10^{-5}$	۲
-	-	$2 \times 10^{-2}$	$<10^{-4}$	$<10^{-5}$	۳
-	-	-	$<10^{-4}$	$<10^{-5}$	۵
-	-	-	$<10^{-4}$	$<10^{-5}$	۷
-	-	-	$<10^{-4}$	$<10^{-5}$	۲۴

اثر عصاره‌های چای سبز و سیاه بر خواص ضد باکتریایی آنتی‌بیوتیک‌ها در برابر E.coli نسبت به مقدار و نوع آنتی‌بیوتیک متفاوت بود. به این ترتیب که عصاره چای سبز، قطره‌های مهار رشد را در آمیکاسین و جنتامایسین به طرز معنی‌داری افزایش می‌داد (p < 0.001) و با افزایش مقدار عصاره، این اثر سینرژیستیک نیز به طرز معنی‌داری افزایش می‌یافتد (p < 0.001). اما افزودن ۱/۲۵ میلی‌گرم عصاره چای سبز به دیسک دو آنتی‌بیوتیک نوروفلوكسازین و سولفوماتاکسازول بطرز معنی‌داری، موجب مهار اثر ضد باکتریایی آنها شد (p < 0.001)، اما با افزایش دوز عصاره چای سبز به ۲/۵ mg این مهار از میان رفت، به طوری که

آمیکاسین (30 µg/disk)، سولفوماتاکسازول (10 µg/disk)، نوروفلوكسازین (10 µg/disk) و جنتامایسین (10 µg/disk).

آزمون آنتی‌بیوگرام به روش دیسک برای دیسک‌های استاندارد ۸ بار و برای دیسک‌های آلوده به عصاره ۱۱ بار در روزهای مختلف انجام شد. سپس از روی آن میانگین قطره‌های مهار رشد محاسبه و برای آنالیز آماری استفاده شد.

**اندازه‌گیری ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی (TAC)**: درصد مهار اکسیداسیون معرف ABTS<sup>1</sup> و احیای رادیکال آن توسط عصاره‌های ۱ mg/ml چای سیاه و سبز در ۳۷°C شد. این روش از آلبومین سرم گاو (BSA)<sup>2</sup> برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد.<sup>(۸)</sup>

**تحلیل آماری:** نرمال بودن توزیع داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف- اسمیرنوف ارزیابی شد. میانگین داده‌ها میان چند گروه با آزمون آنالیز واریانس و سپس بین دو گروه با آزمون توکی مقایسه شد. در موارد توزیع غیرنرمال به ترتیب از آزمونهای کروسکال- والیس و سپس من و تینی- ویلکاکسون استفاده شد. کلیه اختلافها در  $p < 0.05$  معنی‌دار تلقی شد. همه آزمونهای آماری با استفاده از نرم افزار SPSS11.5 انجام شد.

## ۰ یافته‌ها

جدول ۱ و ۲ به ترتیب نتایج اثرات مهاری عصاره‌های چای سیاه و چای سبز را بر رشد E.coli در زمانها و غلظتهای مختلف نشان می‌دهند (به روش pour plate). اثر متقابل غلظتهای مختلف عصاره‌های چای سیاه و سبز با برخی آنتی‌بیوتیک‌ها بر رشد E.coli به روش آنتی‌بیوگرام با دیسک در شکل ۱ و اثر متقابل بالاترین مقادیر مورد آزمایش عصاره‌های چای سیاه و سبز با برخی آنتی‌بیوتیک‌ها بر رشد E.coli در شکل ۲ نشان داده شده است.

برای مطالعه اثرات متقابل و احتمالاً هم افزاینده عصاره‌های چای سیاه و سبز و آنتی‌بیوتیک‌ها با توجه به

1- 2,2-Azino-bis(3-ethylbenz-thiazoline-6-sulfonic acid)

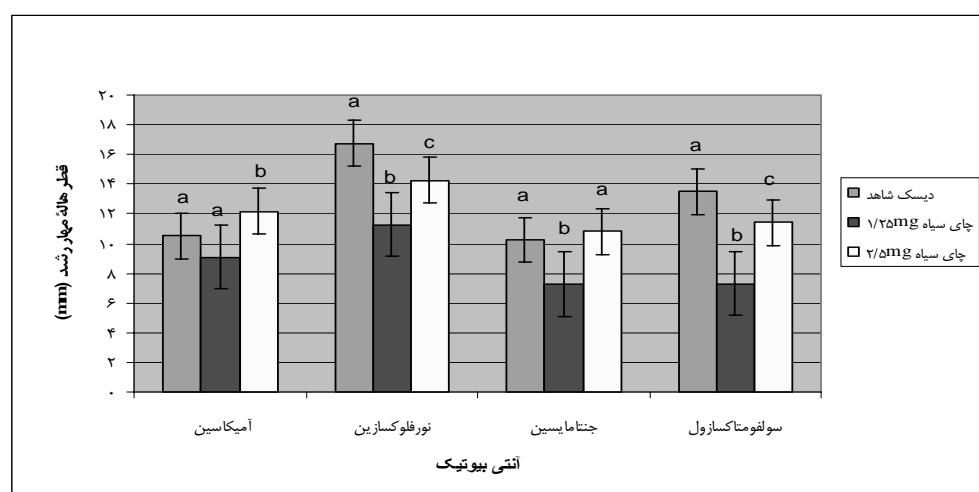
2- Bovine Serum Albumin

به طرز معنی داری کاهش یافت، اما قطر هاله مهار رشد هم چنان به طرز معنی داری از سطح پایه کمتر بود ( $p < 0.02$ )، اما درمورد آمیکاسین و جنتامايسین این کار موجب افزایش قطر هاله مهار رشد شد، به طوری که در جنتامايسین تقریباً به سطح پایه برگشت و در آمیکاسین حتی از آن نیز فراتر رفت ( $p = 0.14$ ).

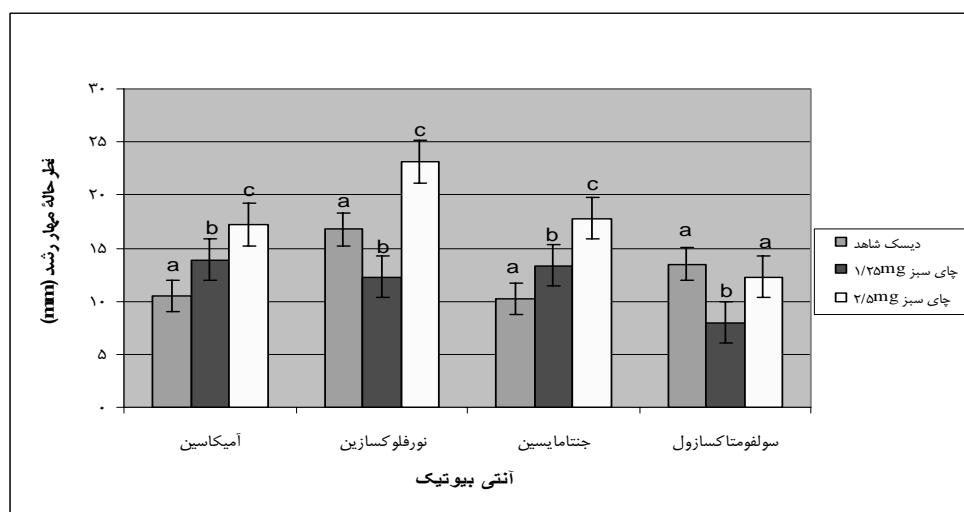
ظرفیت تام آنتی اکسیدانی عصاره  $1\text{ mg/ml}$  چای سبز معادل  $268 \pm 0.11\text{ mM}$  BSA و چای سیاه در غلظت مشابه حدود  $22 \pm 0.10\text{ mM}$  BSA بود ( $p < 0.01$ ).

در مورد سولفومتاکسازول، قطر هاله عدم رشد تقریباً به اندازه معمول برگشت و در مورد نوروفلوكسازین، قطر هاله مهار رشد حتی از سطح پایه نیز فراتر رفت ( $p < 0.01$ ). افزودن  $1/25\text{ mg}$  عصاره چای سیاه به آنتی بیوتیکها تقریباً در همه موارد، موجب مهار اثر ضد باکتریایی و کاهش قطر هاله مهار رشد شد. این کاهش بجز در مورد آمیکاسین در موارد دیگر، معنی دار بود ( $p < 0.1$ ). با دو برابر کردن دوز عصاره چای سیاه، هر چند این اثر مهاری در نوروفلوكسازین و سولفومتاکسازول

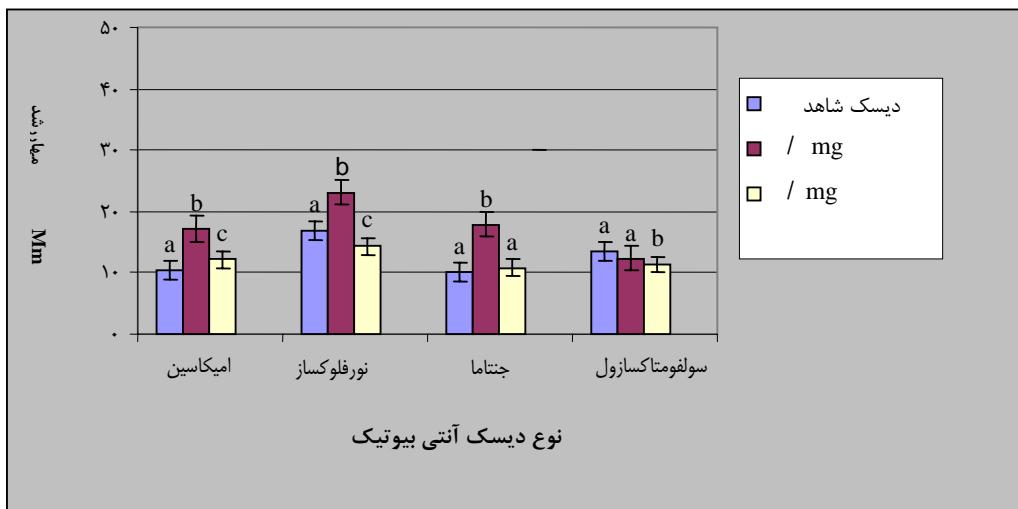
(الف)



( )



شکل ۱- اثر متقابل غلظتهای مختلف عصاره های (الف) چای سیاه و (ب) سبز با برخی از آنتی بیوتیکها روی E.coli به روش آنتی بیوگرام با دیسک. حروف ناهمسان در بالای ستونها نشانگر تفاوت های معنی دار در آن گروه است ( $p < 0.05$ ).



شکل ۲- اثر متقابل بالاترین مقادیر آزمایش عصاره های چای سبز و سیاه با  
برخی از آنتی بیوتیک ها روی *E.coli*

دفاع آنتی اکسیدانی در باکتری موجبات غلبه آن را بر اثرات مهاری تانن ها فراهم می آورند (۱۱). امکان دارد غلظت پلی فنل ها نیز در این پدیده نقش داشته باشد. با این حال، عدم رشد باکتری بعد از ۳ تا ۲۴ ساعت مجاورت با عصاره چای از یک سو و کاهش اثر آنتی بیوتیک ها بر اثر عصاره خام چای از سوی دیگر، امکان تداخلات غذا و دارو را بیشتر قوت می بخشد.

قوی تر بودن اثرات مهاری چای سبز در مقایسه با چای سیاه، این احتمال را مطرح می کند که متabolیت های حاصل از فرایندهای اکسیداسیون در ضمن تخمیر برگ چای هم اثرات مهاری و هم توان آنتی اکسیدانی آن را کم می کند. با این حال، چای سیاه در پاره ای از شرایط همچنان دارای اثرات ضد باکتریایی است و به نظر می رسد که این اثرات با ظرفیت آنتی اکسیدانی آن مرتبط باشد. به نظر می رسد که مصرف ۲ تا ۳ فنجان چای در روز برای بیمارانی که تحت درمان با آنتی بیوتیک های مورد بررسی در این مطالعه هستند، مشکل خاصی را ایجاد نمی کند.

#### سپاسگزاری

این مطالعه، بخشی از یک طرح پژوهشی است که با بودجه انسستیتو تحقیقات تغذیه ای و صنایع غذایی کشور انجام پذیرفته است. بدین وسیله از کلیه همکاران آن

#### • بحث

تانون، گزارش های متعددی درباره اثرات ضد میکروبی انواع چای (۷) و پلی فنل های خالص آن (۴) در برابر انواع میکروب ها منتشر شده اند. اثرات سینرژیسمی چای با آنتی بیوتیک ها نیز گزارش شده است (۶، ۹). در مطالعه ای اثر سینرژیستی عصاره چای و لوفلوفلوكسازین (levofloxacin) بر ضد *E.coli* انتروپاتوژن مشاهده شد (۶). طبق یافته های به دست آمده در این مطالعه این اثر در مورد چای سبز، بارز تر بود. به طوری که در آزمون آنتی بیوتیک ها اثر مهاری داشت. جالب اینکه با همه آنتی بیوتیک ها اثر مهاری داشت. این اثر مهاری به درجه ای افزایش مقدار عصاره به  $2/5\text{mg}$  این اثر مهاری به درجه ای تخفیف یافت. از جمله علل احتمالی این تاثیر را می توان برهم کنش اجزای عصاره چای و آنتی بیوتیک و نهایتاً مهار اثر دارو در غلظتی خاص یا ناکافی بودن مقدار مواد ضد میکروبی چای در مقادیر پایین عصاره چای دانست. گفته شده است که پلی فنل های گیاهی یا اصطلاحاً تانن ها (tanins) از طریق اتو اکسیداسیون و تولید پراکسید هیدروژن، اثرات مهاری خود را بر رشد یاخته (شامل یاخته های میکروبی) اعمال می کنند (۱۱)، ولی در شرایط محیطی خاصی امکان دارد ژن های خاصی در باکتری القاء شوند، مانند *OXYR* در *E.coli* که نهایتاً با افزایش

آزمایشگاه پژوهش‌های تغذیه‌ای گروه تحقیقات تغذیه و منشی این گروه سرکارخانم قنبرزاده که کمال همکاری را در اجرای این مطالعه با ما داشتند، قدردانی کنیم.

### • References

- NataroJP. Atypical enteropathogenic Escherichia coli: typical pathogens? *Ernerv Infect Dis*, 2006; 12: 6960.
- Sugita-Konishiy, Hara-Kudoy, Amana F, Okubot, Aoin, Iwaki M, Kumagais. Epigallocatechin gallate and gallicatechin gallate in gree tea catechins inhibit extracellular release of verotoxin from enterohemorrhagic Escherichia coli 0157:117. *Biochim Biophys Acta*. 1999; 1472:42-50
- Zhao WH, Hu ZQ, Haray, shimamura T. inhibition by epigallo catechin gallate (EGegl) of conjugative R plasmid transfer in Escherichia coli. *J infecet chemother*. 2001; 7: 195-7
- TaguriT, Tanakat, kounoi. Antimicrobial activity of 10 different plant poly phenols against bacteria causing food-borne disease. *Biol pharm Bull*. 2004; 27:1965-9.
- Chon cl, Linll, chungkt. Antimicrobial activity of tea as affected by the degree of fermentation and manufacturing seuson. *Int J food Microbiol*. 1999; 48:125-3D.
- Isogia E, Hirose k, Hayashik Hayashis O. The invivo synergy between green tea extract and levofloxacin a gainst etnterhemorrhagic Escherichia coli 0157 infection. *Curr Microbiol*. 2001; 42: 248-51.
- BandyopadnyayD, chatterjee TK, Dasgupta A, Lourduraja J, DastidarSG. Invitro and invivio antimicrobial action of tea: The commonest beverage of Asia. *Biol pharm Bull*. 2005; 28: 2125-7.
- نیستانی تیرنگ و همکاران. مطالعه اثر مکمل یاری لیکوپن بر استرس اکسیداتیو و دستگاه ایمنی مبتلایان به دیابت نوع ۲، طرح تحقیقاتی، ۱۳۸۵ انتستیتو تحقیقات تغذیه و صنایع غذایی کشور، آزمایشگاه پژوهش‌های تغذیه‌ای، گروه تحقیقات تغذیه.
- TiwariRP, Bhartisk, kaurHD, DikshitRP, Hoondal Gs. Synergistic antimicrobial activity of tea and antibiotics. *Indian J Med Res*. 2005; 122:80-4.
- Hamilton-Miller JMT. Antiacterial properties of tea (*camellia sinensis*). *Antimicrob Agents chemother*. 1995; 36: 2375-7.
- Smith AH, Imlay JA, Mackie RI. Increasing the oxidative stress response allows *Escherichiacoli* to overcome inhibitory effects of condensed tannins. *Appl Environ Microbiol*. 2003 Jun; 69(6): 3406-110.

مرکز، به ویژه معاونت محترم پژوهشی سپاسگزاری می‌شود. پس از سپاس از ایزد منان که ما را در انجام این مطالعه یاری نمود، لازم می‌دانیم از کلیه همکاران