

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

نیلوفر خلجی^۱، نیرنگ نیستانی^۲

- ۱- کارشناس ارشد میکروبیولوژی پزشکی گروه تحقیقات تغذیه، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
- ۲- نویسنده مسئول: استادیار پژوهشی (پژوهشگر) گروه تحقیقات تغذیه، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی. پست الکترونیکی: tneyestani@nnftri.ac.ir

تاریخ دریافت: ۸۵/۸/۱۵

تاریخ پذیرش: ۸۵/۱۱/۲۵

چکیده

سابقه و هدف: اثرات ضد میکروبی چای سبز در مطالعات گوناگون نشان داده شده است. اما مطالعات انجام شده روی اثرات مهارى 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 (*Camellia sinensis*) به روش پركولاسیون، تهیه و خشک شد. سپس غلظت‌های مختلف عصاره تهیه شد. باکتری در محیط مایع در معرض عصاره با غلظت‌های 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 وابسته به دوز روی آنتی‌بیوتیک‌ها اثرات هم افزاینده یا مهارى داشتند. توان آنتی‌اکسیدانی عصاره چای سبز در مقایسه با عصاره چای سیاه به طرز معنی‌داری بالاتر بود.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد که اثرات مهارى چای مستقیماً به توان آنتی‌اکسیدانی آن مربوط است و پلی‌فنل‌های چای در شرایط خاصی به صورت اکسیدان عمل کرده و از این طریق، اثرات مهارى 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 مهارى، 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 زهرابه به نام وروتوکسین

استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها، هسته اصلی درمان در عفونت‌های باکتریایی را تشکیل می‌دهد، ولی به دلیل افزایش روزافزون مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌ها و وجود عوارض جانبی داروها، کاربرد یک روش کمکی برای درمان این عفونت‌ها اهمیت ویژه‌ای پیدا کرده 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، ۵۰، ۲۵ و ۵ میلی گرم در میلی لیتر محیط تیوگلیکولات آماده شد.

محیطهای کشت تیوگلیکولات، (EMB) Mueller Hinton Agar، Eosin Methylen Blue آگار مغذی (Nutrient Agar) (همگی از کارخانه Merck) به روش مندرج روی بسته بندی تهیه شدند. در کشت E.coli روی محیط EMB، پرگنه های 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 ۱ ml از سوسپانسیون باکتریایی، معادل استاندارد ۰/۵ مک فارلند MacFarland (1×10^8 CFU/ml) به غلظتهای تهیه شده از عصاره های چای افزوده و در 37°C انکوبه شد. پس از گذشت ۷، ۲۴، ۳۷ و ۷۲ ساعت، ۱ ml از این لوله ها به پلیت استریل، منتقل و ۱۰ ml از محیط آگار مغذی ذوب شده در 45°C (به پلیت های حاوی E.coli) افزوده شد. پس از پخش یکنواخت باکتری در محیط، همه پلیت ها در دمای 37°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 37°C گذاشته شدند تا خشک شوند. سپس، اثر دیسک های حاوی عصاره چای سبز و سیاه، به تنهایی یا 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 اشریشیاکلی انتروهموراژیک و در نتیجه، مهار بیماریزایی این باکتری می شود. این اثر درمورد پلی فنل های گیاهی نیز گزارش شده است (۲،۱).

همچنین در مطالعه ای در سال ۲۰۰۱ مشخص شد که اپی گالوکاتکین گالات چای باعث کاهش انتقال پلاسמיד بیماریزایی Eolic600 بین R222 (دهنده) و Rc85 (گیرنده) Ecoli k12 می شود (۳).

در پژوهش دیگری اثرات ضد باکتریایی انواع پلی فنل بر چندین گونه باکتری بیماریزا از جمله E.coli بررسی شد، کمترین غلظت مهاری (MIC)^۱ برای E.coli چندین برابر باکتری های دیگر مانند استافیلوکوکوس اورئوس (به ترتیب 1519 ± 949 و 192 ± 91 میکروگرم در میلی لیتر) و حتی بیش از سالمونلا ($795 \pm 590 \mu\text{g/ml}$) بود. پژوهشگران چنین نتیجه گرفتند که احتمالاً وجود گروه های 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، سوپه خالص باکتری انتروپاتوژن E.coli (ATCC: 25920) از سازمان پژوهشهای 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 60°C ، عصاره از کاغذ صافی عبور داده شد و تفاله، فشرده شد تا عصاره کاملاً خارج شود. با افزودن اتانول به تفاله، مراحل قبل تکرار شد. سپس با استفاده از دستگاه تبخیرکننده عصاره، تغلیظ و حجمش به ۲۰ ml رسانده شد. عصاره تغلیظ شده با انکوباسیون در 50°C کاملاً خشک و سپس با کاردک تراشیده و در هاون ساییده شد. از عصاره خشک،

^۱ - minimum inhibitory concentration

نتایج روش pour plate فقط از عصاره‌های چای سبز و سیاه در دو غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم در میلی لیتر استفاده شد.

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

زمان انکوباسیون (ساعت)	غلظت (mg/mL)				
	۱۰۰/۰	۵۰/۰	۲۵/۰	۱۲/۵	۶/۲۵
۱	-	۱۰ ^۳	<۱۰ ^۴	<۱۰ ^۵	<۱۰ ^۵
۲	-	۷×۱۰ ^۲	<۱۰ ^۴	<۱۰ ^۵	<۱۰ ^۵
۳	-	۱۰ ^۲	<۱۰ ^۴	<۱۰ ^۵	<۱۰ ^۵
۵	-	-	<۱۰ ^۴	<۱۰ ^۵	<۱۰ ^۵
۷	-	-	-	<۱۰ ^۵	<۱۰ ^۵
۲۴	-	-	-	<۱۰ ^۵	<۱۰ ^۵

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

زمان انکوباسیون (ساعت)	غلظت (mg/mL)				
	۱۰۰/۰	۵۰/۰	۲۵/۰	۱۲/۵	۶/۲۵
۱	-	۸×۱۰ ^۴	۲×۱۰ ^۳	<۱۰ ^۴	<۱۰ ^۵
۲	-	۵۰	۵×۱۰ ^۲	<۱۰ ^۴	<۱۰ ^۵
۳	-	-	۲×۱۰ ^۲	<۱۰ ^۴	<۱۰ ^۵
۵	-	-	-	<۱۰ ^۴	<۱۰ ^۵
۷	-	-	-	<۱۰ ^۴	<۱۰ ^۵
۲۴	-	-	-	<۱۰ ^۴	<۱۰ ^۵

اثر عصاره‌های چای سبز و سیاه بر خواص ضد باکتریایی آنتی بیوتیک‌ها در برابر E.coli نسبت به مقدار نوع آنتی بیوتیک متفاوت بود. به این ترتیب که عصاره چای سبز، قطر هاله مهار رشد را در آمیکاسین و جنتامایسین به طرز معنی داری افزایش می داد ($p < 0.001$) و با افزایش مقدار عصاره، این اثر سینرژستیک نیز به طرز معنی داری افزایش می یافت ($p < 0.001$). اما افزودن ۱/۲۵ میلی گرم عصاره چای سبز به دیسک دو آنتی بیوتیک نورفلوکسازین و سولفومتاکسازول بطرز معنی داری، موجب مهار اثر ضد باکتریایی آنها شد ($p < 0.001$)؛ اما با افزایش دوز عصاره چای سبز به ۲/۵mg این مهار از میان رفت، به طوری که

آمیکاسین ($30 \mu\text{g}/\text{disk}$)، سولفومتاکسازول ($10 \mu\text{g}/\text{disc}$)، نوروفلوکسازین ($10 \mu\text{g}/\text{disc}$) و جنتامایسین ($10 \mu\text{g}/\text{disc}$).

آزمون آنتی بیوگرام 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 قطر هاله‌های مهار رشد محاسبه و برای آنالیز آماری استفاده شد.

اندازه‌گیری ظرفیت تمام آنتی اکسیدانی (TAC) total antioxidant capacity: درصد مهار اکسیداسیون معرف ABTS^۱ و احیای رادیکال آن توسط عصاره‌های ۱mg/ml چای سیاه و سبز در 37°C اندازه‌گیری شد در این روش از آلبومین سرم گاو (BSA)^۲ برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد (۸).

تحلیل آماری: نرمال بودن توزیع داده ها 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 ویتنی- ویلکاکسون استفاده شد. کلیه اختلافها در $p < 0.05$ معنی دار تلقی شد. همه آزمونهای آماری با استفاده از نرم افزار SPSS11.5 انجام شد.

• یافته ها

جداول ۱ و ۲ به ترتیب نتایج اثرات مهاري عصاره‌های چای سیاه و چای سبز را بر رشد E.coli در زمانها و غلظتهای مختلف نشان می دهند (به روش pour plate). اثر متقابل غلظتهای مختلف عصاره‌های چای سیاه و سبز با برخی آنتی بیوتیکها بر رشد E.coli به روش آنتی بیوگرام با دیسک در شکل ۱ و اثر متقابل بالاترین مقادیر مورد آزمایش عصاره‌های چای سیاه و سبز با برخی آنتی بیوتیکها 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 آنتی بیوتیکها با توجه به

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

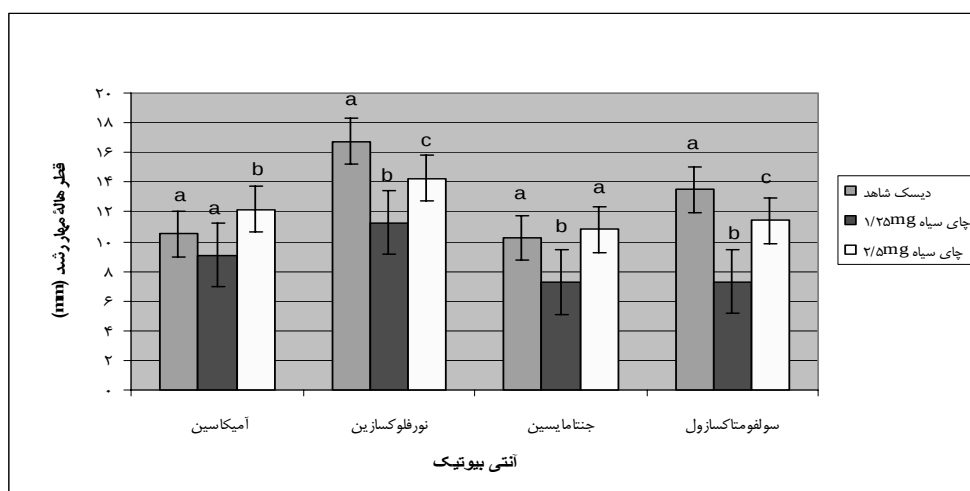
به طرز معنی‌داری کاهش یافت، اما قطر هاله مه‌ر رشد هم چنان به طرز معنی‌داری از سطح پایه کمتر بود ($p < 0.02$)، اما در مورد آمیکاسین و جنتامایسین این کار موجب افزایش قطر هاله مه‌ر رشد شد، به طوری که در جنتامایسین تقریباً به سطح پایه برگشت و در آمیکاسین حتی از آن نیز فراتر رفت ($p = 0.014$).

ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی عصاره 1 mg/ml چای سبز معادل $0.268 \pm 0.11 \text{ mM BSA}$ و چای سیاه در غلظت مشابه حدود $1.22 \pm 0.10 \text{ mM BSA}$ بود ($p < 0.01$).

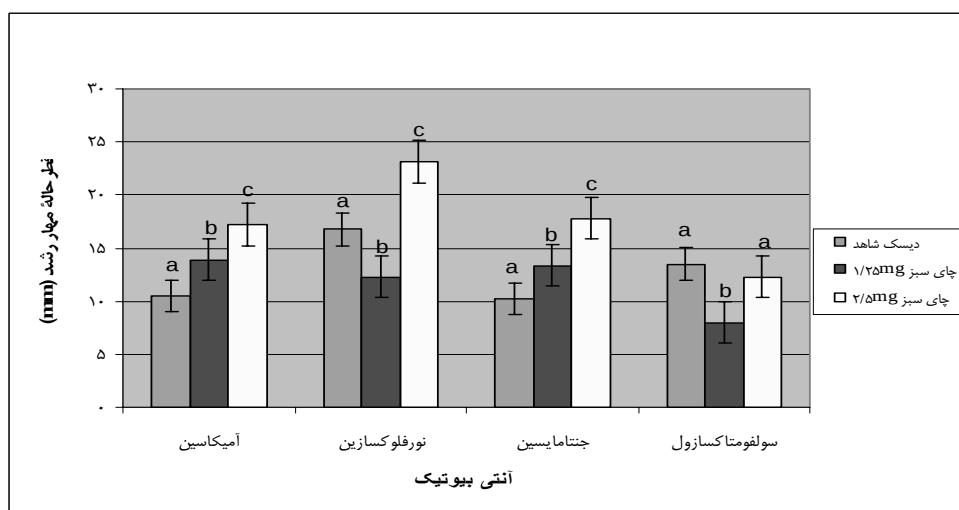
در مورد سولفومتاکسازول، قطر هاله عدم رشد تقریباً به اندازه معمول برگشت و در مورد نورفلوکسازین، قطر هاله مه‌ر رشد حتی از سطح پایه نیز فراتر رفت ($p < 0.001$).

افزودن $1/25$ میلی گرم عصاره چای سیاه به آنتی‌بیوتیک‌ها تقریباً در همه موارد، موجب مه‌ر اثر ضد باکتریایی و کاهش قطر هاله مه‌ر رشد شد. این کاهش بجز در مورد آمیکاسین در موارد دیگر، معنی‌دار بود ($p < 0.01$). با دو برابر کردن دوز عصاره چای سیاه، هر چند این اثر مهاری در نورفلوکسازین و سولفومتوکسازول

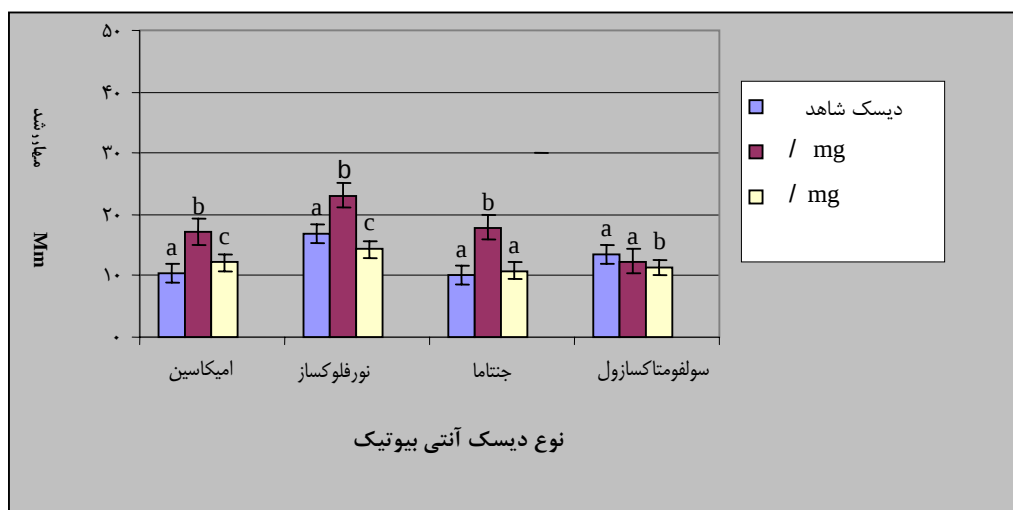
(الف)



(ب)



شکل ۱- اثر متقابل غلظت‌های مختلف عصاره‌های (الف) چای سیاه و (ب) سبز با برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها روی *E. coli* به روش آنتی بیوگرام با دیسک. حروف ناهمسان در بالای ستونها نشانگر تفاوت‌های معنی‌دار در آن گروه است ($p < 0.05$).



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

• بحث

تاکنون، گزارشهای متعددی درباره اثرات ضد میکروبی انواع چای (۷) و پلی فنل های خالص آن (۴) در برابر انواع میکروب ها منتشر شده اند. اثرات سینرژیستی چای با آنتی بیوتیک ها نیز گزارش شده است (۶، ۹). در مطالعه ای اثر سینرژیستی عصاره چای و لووفلوکساسین (levofloxacin) بر ضد *E.coli* انتروپاتوژن مشاهده شد (۶). طبق یافته های به دست آمده در این مطالعه این اثر در مورد چای سبز، بارزتر بود. به طوری که در آزمون آنتی بیوگرام به روش دیسک و در مقدار ۱/۲۵mg روی همه آنتی بیوتیک ها اثر مهاری داشت. جالب اینکه با افزایش مقدار عصاره به ۲/۵mg این اثر مهاری به درجاتی 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 اتواکسیداسیون 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

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 متابولیت 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 انستیتو تحقیقات تغذیه ای و صنایع غذایی کشور انجام پذیرفته است. بدین وسیله از کلیه همکاران آن

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

• References

1. Nataro JP. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli*: typical pathogens? *Emerg Infect Dis*, 2006; 12: 6960.
2. Sugita-Konishiy, Hara-Kudoy, Amana F, Okubot, Aoin, Iwaki M, Kumagais. Epigallocatechin gallate and galocatechin gallate in gree tea catechins inhibit extracellular release of verotoxin from enterohemorrhagic *Escherichia coli* 0157:117. *Biochim Biophys Acta*. 1999; 1472:42-50
3. Zhao WH, Hu ZQ, Haray, shimamura T. inhibition by epigallo catechin gallate (EGcgl) of conjugative R plasmid transfer in *Escherichia coli*. *J infecet chemother*. 2001; 7: 195-7
4. TaguriT, Tanakat, kounoI. Antimicrobial activity of 10 different plant poly phenols against bacteria causing food-borne disease. *Biol pharm Bull*. 2004; 27:1965-9.
5. 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.
6. Isogia E, Hirose k, Hayashik Hayashis O. The invivo synergy between green tea extract and levofloxacin against enterohemorrhagic *Escherichia coli* 0157 infection. *Curr Microbiol*. 2001; 42: 248-51.
7. 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.
۸. نیستانی تیرنگ و همکاران. مطالعه اثر مکمل یاری لیکوپن بر استرس اکسیداتیو و دستگاه ایمنی مبتلایان به دیابت نوع ۲، طرح تحقیقاتی، ۱۳۸۵ انستیتو تحقیقات تغذیه و صنایع غذایی کشور، آزمایشگاه پژوهشهای تغذیه ای، گروه تحقیقات تغذیه.
9. TiwariRP, Bhartisk, kaurHD, DikshitRP, Hoondal Gs. Synergistic antimicrobial activity of tea and antibiotics. *Indian J Med Res*. 2005; 122:80-4.
10. Hamillton-Miller JMT. Antiarterial properties of tea (*camellia sinensis*). *Antimicrob Agents chemother*. 1995; 36: 2375-7.
11. 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.