Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 9:03 +0430 on Thursday June 21st 2018

مقایسه اثرات چای سیاه و چای سبز بر رشد و تشکیل بیوفیلم در میکروارگانیسم های خانوادهٔ انتروباکتریاسه

علیرضا شعاع حسنی[۱]، نگار اردوزاده[۲]، امیر قائمی[۳*]، راشد نظری[۴]، کسری حمدی[۲]، داود حکمت پو[۵]

۱- دانشجوی دکترای تخصصی میکروبیولوژی ،گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد واحد علوم و تحقیقات تهران.

۲ - کارشناس ارشد میکروبیولوژی ،گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد واحد علوم و تحقیقات تهران.

۳- دانشجوی دکترای تخصصی ویروس شناسی دانشگاه تربیت مدرس، عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی گرگان

۴- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوفیزیک ،گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد واحد علوم و تحقیقات تهران.

۵- دانشجوی دکترای تخصصی آموزش پرستاری دانشگاه تربیت مدرس ،عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی اراک.

تاریخ دریافت ۸۶/۱۰/۲۵، تاریخ پذیرش ۸۷/۲/۱۸

چکیده

مقدمه: برگ سبز چای (Camellia sinensis L) حاوی ترکیبات پلی فنلی با اثرات ضد میکربی می‌باشد. از آنجا که چای از نوشیدنی‌های بسیار پرطرفدار در ایران می‌باشد لذا تاثیر آن بر تشکیل بیوفیلم و کلونیزه شدن عوامل ایجاد عفونت‌های روده‌ای و عفونت‌های فرصت طلب بیمارستانی اهمیت زیادی دارد. هم‌چنین با جدا کردن ترکیبات بازدارندهٔ تشکیل بیوفیلم می‌توان از آنها به عنوان نگهدارندهٔ مواد غذایی در صنایع استفاده نمود. در این پژوهش اثر ممانعت کنندگی عصاره‌های چای سیاه و سبز از تشکیل بیوفیلم، در ۵ باکتری از خانوادهٔ انتروباکتریاسه شامل اشریشیا کلی انتروپاتوژن، سالمونلا انتریکا سرووار تایفی موریوم، کلبسیلا نومونیه، پروتئوس میرابیلیس و شیگلا فلکسنری سنجیده شد و با هم مقایسه گردید.

روش کار: در این مطالعه تجربی پس از عصاره‌گیری نمونه‌ها توسط عصاره‌گیر Soxhlet با استفاده از حلال متانول ۵۰ درصد و جدا نمودن مجدد در فاز اتیل استات، عصاره‌ها پس از استریل شدن توسط فیلتر ۰/۴۴ میکرون تا زمان استفاده در یک فانل استریل در ۴ درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شدند. از روش انتشار چاهک (طبق روش کربی بائر) برای محاسبهٔ حداقل غلظت بازدارندگی و از روش تهیهٔ رقت در محیط مایع برای بررسی تشکیل بیوفیلم در کشت‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف عصاره‌ها استفاده شد. ارزیابی تشکیل بیوفیلم با نمونه‌برداری از جدار ارلن مایر حاوی محیط‌های تیمار شده و کشت آن روی تریپتیکاز سوی آگار و شمارش کلنی‌ها و سپس مقایسه آن با کشت‌های شاهد صورت گرفت. تحلیل آماری داده‌ها با آزمون آنالیز واریانس انجام شد.

نتایج: اثر ممانعت کنندگی از تشکیل بیوفیلم در چای سیاه بیشتر از چای سبز بود. غلظت ۴/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از عصارهٔ چای سیاه و ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از عصارهٔ چای سبز، اثر باکتریسایدی بر این میکروارگانیسم‌ها داشت. در میان این باکتری‌ها پروتئوس میرابیلیس بیشترین حساسیت به چای سیاه و اشریشیا کُلی انتروپاتوژن بیشترین حساسیت را به چای سبز داشتند و کلبسیلا نومونیه بیشترین مقاومت را نسبت به هر دوی این عصاره‌ها نشان داد.

نتیجه گیری: از آنجا که چای به طور مستقیم پس از نوشیدن بر دستگاه گوارشی تاثیر می‌گذارد، منجر به کاهش انتروباکتریاسه‌ها و کاهش کلونیزاسیون آنها بر سطح سلول‌های اپی تلیال دستگاه گوارشی، کاهش خطر عفونت‌های روده‌ای و کاهش تولید مواد سرطان زا از قبیل اسکاتول در اثر متابولیسم این باکتری‌ها در روده می‌شود. هم‌چنین می‌توان از پلی فنل‌های چای به عنوان نگهدارندهٔ مواد غذایی در صنایع نیز بهره گرفت.

واژگان کلیدی: عصاره چای سیاه و سبز، تشکیل بیوفیلم، انتروباکتریاسه، ضد باکتریایی

* **نویسنده مسئول:** گرگان، کیلومتر ۲ جاده گرگان- ساری، دانشگاه علوم پزشکی گرگان (بنیاد فلسفی) گروه میکروب شناسی، صندوق پستی ۱۱۴۱-۴۹۱۷۵

Email:ghaem_amir@yahoo.com

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 9:03 +0430 on Thursday June 21st 2018

مقدمه

چای مانند قهوه در ردیف رایج‌ترین و مهم‌ترین نوشابه‌های مطبوع و مورد مصرف در جهان می‌باشد. چای سبز از برگ‌های جوان گیاه کاملیاسینسیس[1] تهیه می‌شود. این نکته حائز اهمیت است که برگ‌های چای پس از برداشت، آنزیم پلی فنل اکسیدازشان غیر فعال شود تا مانع اکسیداسیون کاتچین‌های چای شود و مواد موثر آنها پایدار باقی بماند. اگر به آنزیم پلی فنل اکسیداز اجازهٔ فعالیت بیشتری داده شود و درجه حرارت تخمیر نیز افزایش یابد، چای سیاه حاصل می شود(۱). مجموعهٔ پلی فنل‌های اکسیده شدهٔ چای را تانن می‌نامند که به طور کل با سایر تانن‌های گیاهی متفاوت است(۲). چای نوشیدنی پر طرفداری است که در کشورهایی مانند چین، ژاپن و بعضی دیگر از کشورهای شرق آسیا به صورت چای سبز و در اروپا، غرب آسیا و هند به صورت چای سیاه مصرف می‌شود. کشت چای در ایران از سال ۱۳۱۹ هجری توسط کاشف السلطنه در شهر لاهیجان عملی شد. در ایران بیشتر مصرف چای به صورت چای سیاه و کمتر به صورت چای سبز است. البته در سال‌های اخیر کارخانجاتی در شهرستان لاهیجان اقدام به فرآوری چای سبز نموده‌اند که به تدریج مصرف چای سبز در ایران نیز گسترش بیشتری خواهد یافت. چای سبز غنی از مواد آنتی اکسیدان، ضد التهاب و ضد سرطان است (۳). در هرفنجان چای سبز بین ۵۰ تا ۱۰۰ میلی گرم از پلی فنل‌ها و ۱۰ تا ۵۰ میلی گرم کافئین با تاثیر آرام بخشی وجود دارد. از مواد دیگر موجود در چای سبز، فلاوونول‌ها، تیانین و ترکیبات معطر است. در صورتی که برگ‌های سبز چای به صورت مستقیم حرارت داده شوند کاتچین‌ها از قبیل اپی کاتچین، اپی گالوکاتچین، اپی کاتچین گالات و اپی گالوکاتچین گالات تجزیه می‌شوند. در فرهنگ‌های آسیایی که زیاد از چای سبز استفاده می‌شود، چای با حرارت غیر مستقیم بخار آب دم می‌کشد تا اپی گالوکاتچین آن حفظ شود. کاتچین یک آنتی اکسیدان بسیار قوی می‌باشد و از رشد سلول‌های سرطانی ممانعت می‌کند(۴). از اولین گزارشات در مورد اثر ضد میکربی چای، به کار گیری آن به دستور یک پزشک ارتشی در بطری‌های آب سربازان برای پیش‌گیری از تیفوئید بود(۵). پس از آن تا سال‌های زیادی این موضوع فراموش شد. اگر چه چندین گزارش در مورد اثرات ضد میکربی چای درشرایط آزمایشگاه و بدن و شرایط آزمایشگاه در آن دوران وجود دارد ولی تمام آنها سطحی، گذرا و مقطعی بودند(۸-۶) تا این که در دههٔ اخیر پژوهش‌های جدیدی در این مورد، به خصوص توسط پژوهش‌گران ژاپنی صورت گرفت(۹). توط و همکاران در سال ۱۹۸۹ ثابت کردند که عصاره‌های چای باعث کشتن یا ممانعت از رشد باکتری‌های بیماری‌زایی مانند استافیلوکوک اورئوس، استافیلوکوک اپیدرمایدیس، شیگلا دیسانتری و گونه‌های ویبریو، مانند ویبریو کلرا می‌گردد(۱۰) هم‌چنین آنها گزارش نمودند که غلظت‌هایی از چای موجود در یک فنجان چای (۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) قادر به از بین بردن استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی سیلین می‌گردد(۱۱). دانشمندان دیگر هم نشان دادند که پلی فنل‌های برگ سبز چای اثر مهاری بر رشد اشریشیا کلی، استرپتوکوک‌ها و استافیلوکوک اورئوس دارد(۱۲). یافتهٔ مشابهی هم در مورد بوردتلا پرتوسیس (عامل سیاه سرفه) ثابت گردید(۱۳). هم‌چنین محققان یافتند که عصاره‌های چای بر ضد گونه‌های کلاستریدیوم، باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی مانند اروینیا و گونه‌های سودوموناس موثر می‌باشند(۱۴). نظرات مخالفی هم در مورد این که کدام گونه‌های باکتریایی در مقابل چای حساسند وجود دارد که به احتمال زیاد این اختلافات ناشی از تغییر سویه ها و منابع چای‌های مورد استفاده می‌باشد(۱۵).

انتروباکتریاسه شایع‌ترین گروه از باسیل‌های گرم منفی شناسایی شده از نمونه ها در آزمایشگاه‌های کلینیکی اند که موجب بیماری در انسان می‌گردند. این باکتری‌ها در همه جا پراکنده بوده و باعث بیماری‌های اپیدمیک می‌گردند. به جز جنس‌های کلبسیلا و شیگلا که غیر متحرکند سایرین دارای تاژه‌های پیرامونی هستند. برای تمایز

[1] - Camellia sinensis.

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 9:03 +0430 on Thursday June 21st 2018

گونه‌های مختلف انتروباکتریاسه می‌توان به سادگی از محیط‌های بیوشیمیایی استفاده کرد. علائم بیماری که توسط خانوادهٔ انتروباکتریاسه ایجاد می‌شود به مکان عفونت بستگی دارد، شایع‌ترین بیماری‌های ایجاد شده توسط این باکتری‌ها شامل عفونت مجرای ادراری، بیماری‌های اسهالی، تب روده‌ای، انترکولیت، عفونت خون، مننژیت و پنومونی می‌باشد(۱۶).

اثرات ضد میکربی چای، به خصوص چای سبز در مطالعات بسیاری نشان داده شده است ولی ارزیابی اثرات مهاری چای بر روی بیوفیلم باکتریایی، که نقش مهمی در مقاومت نسبت به مواد ضد میکربی و آنتی بیوتیک‌ها دارد، صورت نگرفته است و از آنجا که استفاده از نگهدارنده‌های مواد غذایی در صنایع، جهت جلوگیری از فساد میکربی، علاوه بر هزینه‌های زیادی که دارند، عوارض نامطلوب و اثرات زیان باری بر سلامت انسان نیز می‌گذارند، لذا یافتن فرآورده‌های طبیعی مانند مشتقات چای، که فاقد عوارض جانبی و مخاطرات برای سلامت انسان باشند ضروری به نظر می‌رسد.

روش کار

مواد خام مورد استفاده در این مطالعه تجربی، چای سبز و چای سیاه بودند. برگ سبز چای در اردیبهشت ماه از باغات کوهستانی شهرستان لاهیجان واقع در شمال ایران به دست آمد. چند نمونه از چای سیاه بدون هرگونه اسانس و افزودنی هم از کارخانجات محلی خریداری شد. جهت بررسی اثر ضد میکربی عصارهٔ چای سبز و چای سیاه و هم‌چنین اثر آنها بر تشکیل بیوفیلم، سویه‌های استاندارد اشریشیا کُلی انتروپاتوژن PTCC 1271، پروتئوس میرابیلیس PTCC 1077، کلبسیلا نومونیه ATCC 12658، سالمونلا انتریکا سرووار تیفی موریوم ATCC 14028 و شیگلا فلکسنری PTCC 1234 ، تهیه شده از بانک میکربی مرکز رفرانس میکرب شناسی ایران مورد آزمایش قرار گرفتند. جهت کشت اولیهٔ سویه ها از نوترینت براث به همراه ۰/۵ درصد عصارهٔ مخمر و ۰/۱ درصد گلوکز استفاده شد (مرک، آلمان). جهت تشکیل بیوفیلم از همین محیط کشت استفاده شد و برای ارزیابی قابلیت ضد میکربی و حداقل غلظت بازدارندگی عصاره ها از رشد باکتریایی، از محیط مولر هینتون آگار (دیفکو، فرانسه) استفاده گردید. کشت سویه‌ها جهت تعیین CFU/ml[1] قبل و بعد از اثر عصاره‌ها روی محیط تریپتیکاز سوی آگار صورت گرفت.

برگ‌های تازه، لطیف و سبز چای به صورت دوغنچه‌ای پس از برداشت شدن از بوته‌ها، در محل برداشت مالش داده شده و تحت حرارت ملایمی قرار گرفتند تا دچار تخمیر آنزیمی نگردند. سپس در کیسه‌های استریل حمل نمونه به آزمایشگاه میکرب‌شناسی دانشگاه علوم و تحقیقات تهران انتقال یافتند. این برگ‌های سبز خشک شده و مالش یافته، آسیاب شدند و عصاره‌گیری با استفاده از ۵ گرم نمونهٔ مورد نظر در ۱۰۰ میلی لیتر مخلوط ۵۰ درصدی آب و متانول به عنوان حلال، در دستگاه عصاره گیر Soxhlet انجام گردید و عصارهٔ سبز تیره‌ای از آن به دست آمد که دوباره توسط فاز اتیل استات جدا گردید، از نمونهٔ چای سیاه خریداری شده هم به همین صورت عمل عصاره‌گیری انجام شد و عصاره‌ها پس از فیلتر شدن توسط فیلتر ۰/۴۴ میکرون تا زمان استفاده در یک فانل استریل، در یخچال ۴ درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شدند.

برای سنجش تاثیر ضد باکتریایی عصاره‌های چای سیاه و سبز، از روش انتشار چاهک (کربی – بائر[2]) استفاده شد (۱۷). چاهک هایی با قطر ۵ میلی‌متر روی پلیت های مولر هینتون آگار ایجاد شد و به ۵۰ میکرولیتر از عصاره‌های با غلظت ۱۰۰ میلی گرم در میلی‌لیتر چای سبز و سیاه آغشته گردی تا غلظت نهایی ۵ میلی‌گرم در میلی لیتر حاصل شود. از کشت ۵ ساعتهٔ باکتری‌های مورد نظر در محیط نوترینت براث حاوی ۰/۱ درصد گلوکز و ۰/۵ درصد عصارهٔ مخمر،

[1] - Coloni Forming Umt/ millilitre.
[2]- Kirby Bauer.

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 9:03 +0430 on Thursday June 21st 2018

توسط سواب بر روی محیط‌های مولر هینتون آگار، کشت پر داده شد و تا حصول نتیجه، به مدت ۱۸ ساعت در ۳۵ درجهٔ سانتی‌گراد گرماگذاری گردید. برای کنترل مثبت از کلرامفنیکل ۵ میکروگرم و به عنوان کنترل منفی از سرم فیزیولوژی استریل استفاده شد. حداقل غلظت مهار کنندگی(MIC[1]) به عنوان کمترین غلظتی که قادر به مهار هرگونه رشد قابل مشاهده است با اندازه‌گیری قطر هالهٔ عدم رشد باکتری‌ها در اطراف چاهک حاوی عصاره‌های مورد استفاده، تعیین گردید. در مرحلهٔ بعد ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون حاوی 10^7 CFU/ml از باکتری‌های مورد آزمایش وارد ارلن‌های حاوی ۹ میلی‌لیتر محیط نوترینت براث شدند که در نهایت حاوی غلظت ۵ میلی گرم در میلی لیتر از عصاره‌های چای سیاه و سبز بود و در فواصل ۱۰ دقیقه‌ای از آنها نمونه برداشت گردید و بر روی محیط تریپتیکاز سوی آگار کشت داده شد تا مقدار باکتری‌های زندهٔ آن محاسبه گردیده و نمودار مربوط به آن رسم گردد. جهت بررسی اثر این عصاره‌ها بر تشکیل بیوفیلم توسط میکروارگانیسم‌های مورد آزمایش از روش تهیهٔ رقت در محیط مایع استفاده شد (۱۸). از کشت ۱۸ ساعتهٔ میکروارگانیسم های مورد نظر در محیط نوترینت براث، به کمک اسپکتروفتومتر Shimadzo UV 120-01 سوسپانسیون‌هایی با غلظت 10^7CFU/ml تهیه گردید و ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون‌های هر کدام از باکتری‌ها به ۱۲ ارلن مایر تلقیح شد که در نهایت حاوی ۰، ۰/۵ ، ۱، ۱/۵، ۲، ۲/۵ ، ۳، ۳/۵، ۴، ۴/۵ ، ۵ و ۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از عصاره‌های چای سیاه و سبز در محیط نوترینت براث غنی شده با ۰/۱ درصد گلوکز و ۰/۵ درصد عصارهٔ مخمر بودند. این ارلن ها در ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد گرماگذاری شده و به طور روزانه به مدت یک ماه با چشم غیر مسلح و هم‌چنین زیر لوپ مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه‌برداری روزانه از جدارهٔ ارلن مایر برای مشاهده در زیر میکروسکوپ نوری و کشت نمونه در محیط تریپتیکاز سوی آگار جهت شمارش کلنی‌های موجود بر سطح دیوارهٔ ارلن و مقایسهٔ آمار آن با کشت‌های جدارهٔ ارلن‌های تیمار نشده (شاهد) انجام شد تا مرفولوژی و تغییر ظاهری باکتری‌ها مورد بررسی قرار گیرد. تمام اطلاعات بر اساس سه بار تکرار در هر مرحلهٔ آزمایش ارائه گردید، از محیط‌های تیمار نشده به عنوان شاهد استفاده گردید و میانگین اندازه‌گیری‌ها در سه تکرار انجام شد و تحلیل آماری آن با آزمون آنالیز واریانس و با در نظر گرفتن $p<0/001$ تعیین گردید.

نتایج

بیشترین فعالیت ضد میکربی با حداقل غلظت مهارکنندگی ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در چای سیاه دیده شد. قطر منطقهٔ مهار رشد برای اشریشیا کلی انتروپاتوژن ۲۳ میلی‌متر، پروتئوس میرابیلیس ۲۴ میلی‌متر، سالمونلا تایفی موریوم ۱۹ میلی‌متر، شیگلا فلکسنری ۱۷ میلی‌متر و برای کلبسیلا نومونیه ۱۵ میلی‌متر بود. این مقادیر از نظر فعالیت ضد باکتریایی در مقایسه با نمونهٔ کنترل مثبت یعنی آنتی بیوتیک کلرامفنیکل ۵ میکروگرم که هاله‌های عدم رشدی به اندازهٔ ۲۵ میلی‌متر در اشریشیا کلی، پروتئوس میرابیلیس، و شیگلا فلکسنری، ۲۷ میلی‌متر در سالمونلا انتریکا سرووار تایفی موریوم و ۲۴ میلی‌متر در کلبسیلا نومونیه ایجاد می‌کند، قابل ملاحظه است. عصارهٔ چای سبز نیز در MIC برابر با ۵ میلی گرم در میلی‌لیتر دارای فعالیت ضد باکتریایی بود که البته تاثیر آن مقداری کمتر از اثر چای سیاه بود. ناحیهٔ ممانعت از رشد در این غلظت از عصارهٔ چای سبز به ترتیب برای اشریشیا کلی، پروتئوس میرابیلیس، سالمونلا انتریکا سرووار تایفی موریوم، شیگلا فلکسنری و کلبسیلا نومونیه؛ ۱۶/۵، ۱۶، ۱۶ ، ۱۵/۵ و ۱۴ میلی‌متر اندازه گرفته شد. نتایج کامل این بررسی‌ها در جدول ۱ دیده می‌شود.

در بررسی ارلن‌های تلقیح شده با این میکروارگانیسم‌ها، تشکیل بیوفیلم بر سراسر جدارهٔ داخلی ارلن‌های حاوی اشریشیا کلی انتروپاتوژن و سالمونلا انتریکا سرووار تایفی موریوم پس از ۱۰ ساعت و در سایر ارلن‌هایی

[1]- Minimum Inhibitor Concentration.

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 9:03 +0430 on Thursday June 21st 2018

که فاقد هرگونه عصارهٔ چای بود پس از ۱۸ ساعت کاملاً واضح بود. در روز سوم در تمام ارلن‌های حاوی ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از عصاره های چای سبز و سیاه تشکیل بیوفیلم به وضوح دیده شد. در ارلن‌های حاوی غلظت ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از عصارهٔ چای سبز، در روز پنجم تشکیل بیوفیلم مشهود بود ولی در مورد ارلن‌های حاوی همین غلظت عصارهٔ چای سیاه، بیوفیلم در روز دهم دیده شد (شکل ۱). غلظت ۳ میلی‌گرم در میلی لیتر از عصارهٔ چای سیاه و ۴ میلی‌گرم در میلی لیتر از عصارهٔ چای سبز اثر بازدارندگی کامل بر تشکیل بیوفیلم داشت و در ارلن‌های حاوی غلظت ۴/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصارهٔ چای سیاه و ۵ میلی‌گرم در میلی لیتر عصارهٔ چای سبز، رشد باکتری‌ها دیده نشد و عصاره‌ها در این غلظت اثر باکتریسایدی از خود نشان دادند ولی اگر به محیطی که حاوی بیوفیلم بالغ این میکروارگانیسم‌ها بود غلظتی معادل ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از عصاره‌های چای سیاه یا سبز وارد می‌شد، قادر به تاثیر بر روی بیوفیلم بالغ و کشتن باکتری‌ها در حالت بیوفیلمی نبود و تقریباً نیاز به دو برابر غلظت عصاره‌های مصرفی نسبت به شرایط پلانکتونی داشت به صورتی که ۸ میلی‌گرم در میلی لیتر از عصارهٔ چای سیاه و ۹ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصارهٔ چای سبز می توانست روی بیوفیلم این باکتری ها اثر کرده و از گسترش آنها جلوگیری کند.

یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون حاوی CFU/ml 10^7 از هر کدام از جنس‌های باکتریایی مورد آزمایش که وارد ۹ میلی‌لیتر از محیط نوترینت براث حاوی ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از عصاره‌های چای سیاه و سبز (غلظت نهایی CFU/ml 10^6) شده بود، در فواصل ۱۰ دقیقه‌ای نمونه‌برداری گردیده و روی محیط تریپتیکاز سوی براث کشت داده شد و تعداد باکتری‌های زنده محاسبه گردید که نمودارهای مربوط به آنها در نمودار های ۱و ۲ دیده می‌شود. کاهش تعداد باکتری‌ها از الگوی MIC آنها روی پلیت‌های مولر هینتون آگار متابعت می‌کرد به طوری که ۱۰ دقیقه پس از تلقیح به محیط نوترینت براث حاوی ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصارهٔ چای سیاه، تعداد کلبسیلا نومونیه به $10^4 \times$ ۱۵/۶ و پروتئوس میرابیلیس به CFU/ml $10^4 \times$ ۱۴/۵ رسید و پس از ۶۰ دقیقه این تعداد به ترتیب ۱۲۵ و ۳۳ باکتری در هر میلی‌لیتر از محیط بود و ۷۰ دقیقه پس از تلقیح در هیچ کدام از محیط‌ها باکتری‌ها قابل بازیابی نبودند. در همین غلظت از عصارهٔ چای سبز، ۱۰ دقیقه پس از تلقیح تعداد کلبسیلا نومونیه به $10^4 \times$ ۱۹ و اشریشیا کُلی به CFU/ml $10^4 \times$ ۱۶/۵ رسید. پس از ۷۰ دقیقه این تعداد به ترتیب ۱۹۰ و ۴۰ باکتری در هر میلی‌لیتر از محیط بود و ۸۰ دقیقه پس از تلقیح تعداد این ارگانیسم ها به صفر رسید. مقایسهٔ بین اثرات عصاره‌های چای سیاه و سبز ۶۰ دقیقه پس از تیمار در نمودار ۳ دیده می‌شود.

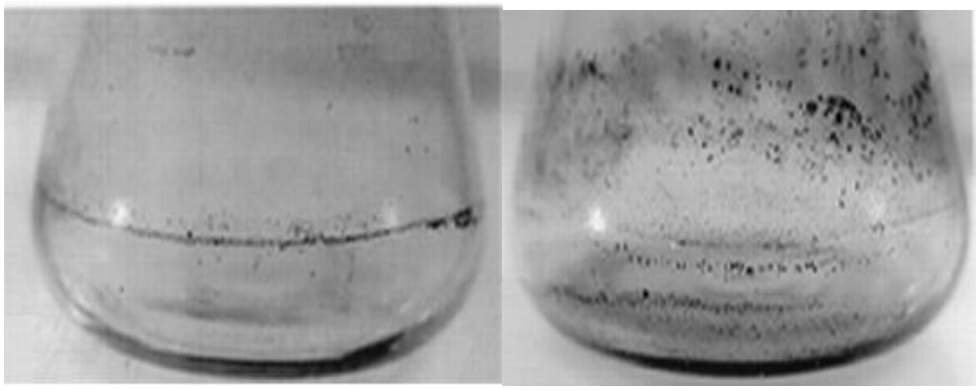
بحث

چای را که به مقدار زیادی به صورت روزمره به مصرف می‌رسد می‌توان برای مقاصد پزشکی هم مورد استفاده قرار داد. در سال ۱۸۸۹ هارا و ایشی گامی ادعا نمودند که سالمونلا تایفی موریوم و کمپیلوباکتر ججونی به چای مقاومند (۱۵) ولی سایر محققان گزارش کردند که این گونه‌ها هم به چای حساس می‌باشند(۷، ۱۰) احتمالا جهش‌هایی که در سویه‌های باکتریایی رخ می‌دهد از عوامل اختلاف نتایج بوده است. هم‌چنین نوع نمونه‌های چای و طرز عصاره‌گیری تاثیر زیادی در نتایج آزمایش خواهند داشت.پژوهش حاضر کاربرد چای به هر دو صورت چای سیاه و سبز، جهت مهار انتروباکتریاسه و ممانعت از تشکیل بیوفیلم توسط آنها را تایید می کند. غلظت ۴/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از عصارهٔ چای سیاه و ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر چای سبز باعث توقف رشد تمام گونه‌های باکتریایی مورد آزمایش گردید.

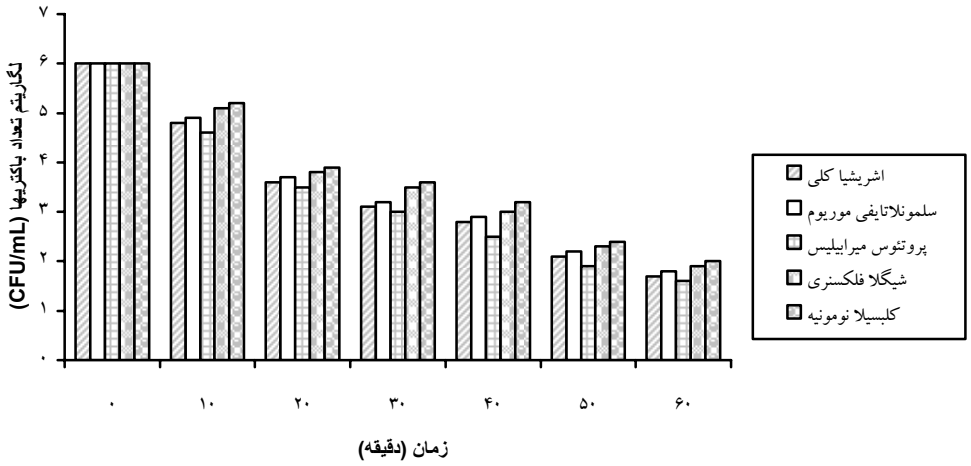
Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 9:03 +0430 on Thursday June 21st 2018

جدول ۱. حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره های چای سیاه و چای سبز.

میکروارگانیسم	ناحیهٔ ممانعت از رشد (میلی متر)		
	عصارهٔ چای سبز ۵ میلی‌گرم/ میلی لیتر	عصارهٔ چای سیاه ۵ میلی‌گرم/ میلی لیتر	کلرامفنیکل ۵ میکروگرم
اشریشیا کلی انتروپاتوژن PTCC 1271	۱۶,۵	۲۳	۲۵
سالمونلا تایفی موریوم ATCC 14028	۱۶	۱۹	۲۷
شیگلا فلکسنری PTCC 1234	۱۵,۵	۱۷	۲۵
کلبسیلا نومونیه ATCC 12658	۱۴	۱۵	۲۴
پروتئوس میرابیلیس PTCC 1077	۱۶	۲۴	۲۵

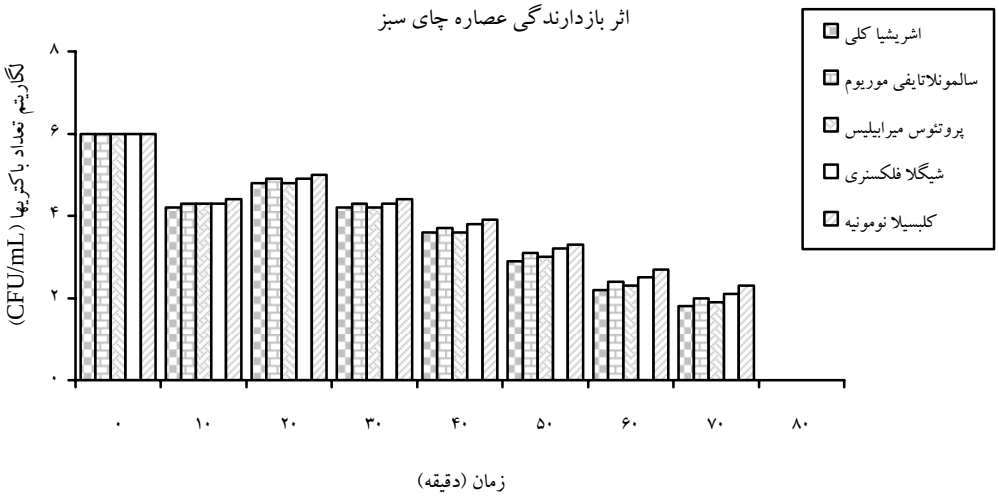


شکل ۱. تشکیل بیوفیلم E .coli بر جدار ارلن پس از ۵ روز در محیط حاوی ۲ میلی‌گرم در میلی لیتر عصارهٔ چای سبز (تصویر سمت راست)، عدم تشکیل بیوفیلم در محیط E .coli تیمار شده با غلظت ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از عصارهٔ چای سیاه پس از ۵ روز (تصویر سمت چپ).

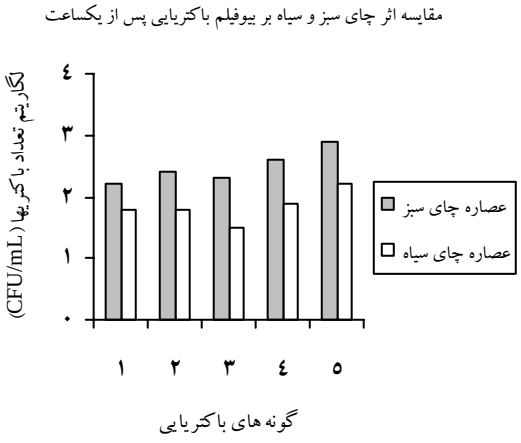


نمودار۱. اثر ضد باکتریایی عصارهٔ چای سیاه در غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر (تعداد باکتری‌ها در دقیقهٔ صفر برابر 10^6 CFU/ml می‌باشد).

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 9:03 +0430 on Thursday June 21st 2018



نمودار ۲. اثر ضد باکتریایی عصارهٔ چای سبز در غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر (تعداد باکتری‌ها در دقیقهٔ صفر برابر 10^6 CFU/ml می‌باشد).



نمودار ۳. مقایسهٔ اثر عصاره‌های چای سیاه و سبز پس از ۶۰ دقیقه در غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر(تعداد باکتری‌ها در دقیقهٔ صفر برابر log CFU/ml ۶ می‌باشد). گونه‌های باکتریایی عبارتند از ۱- اشریشیا کلی ۲- سالمونالتیفی موریوم ۳- پروتئوس میرابیلیس ۴- شیگلا فلکسنری ۵- کلبسیلانومونیه

اثر بازدارندگی چای سیاه بر روی این باکتری‌ها بیشتر از چای سبز بود (شکل ۴) که نشان دهندهٔ فعالیت ضد میکربی بیشتر تیافلاوین و تیاروبیجینی است که در چای سیاه در اثر اکسیده شدن پلی فنل‌ها به وجود می‌آید. هاتوری و همکاران نیز در سال ۱۹۹۰ (۱۹) و هم‌چنین فوکائی و همکاران در سال ۱۹۹۱ (۲۰) گزارش کردند که فعالیت تیافلاوین مانند کاتچین‌ها بوده و از اینرو دارای خاصیت ضد میکربی بالایی می‌باشد.

اجزای فرار طعم دهندهٔ چای نیز که به مقدار کمی وجود دارند۱۰ تا ۲۰ قسمت در میلیون (PPm)، دارای خاصیت ضد میکربی هستند و چون این اجزاء در چای سیاه بسیار بیشتراز چای سبز وجود دارند از اینرو یکی از عوامل بازدارندگی بیشتر چای سیاه بر انتروباکتریاسه را می‌توان اثر این عناصر دانست. از طرفی به تدریج در دمای محیط و بالاتر از آن سرعت خروج این اجزای فرار از محلول عصاره‌های چای بیشتر می‌شود و به همین دلیل پس از گذشت چند روز باکتری هایی که در غلظت‌های پایینتر از حدکشندگی عصاره‌ها قرار گرفته بودند قادر به ایجاد بیوفیلم بر جدار ارلن می‌شوند، در صورتی که در روزهای نخست بسته به غلظت عصاره‌ها، چنین توانایی را ندارند.

در سال ۱۹۸۰، استوگ و همکاران حدود ۳۰۰ نوع از این عناصر طعم دهندهٔ فرار را در چای سیاه (۲۱) و کوبو و همکاران در سال ۱۹۹۲ نزدیک به ۱۰۰ نوع از این اجزاء را در چای سبز یافتند(۲۲). موروی و کوبو در سال ۱۹۹۳ نشان دادند که ترکیبی از عناصر طعم دهندهٔ چای، به خصوص اندول به همراه ترپن‌ها باعث تقویت خاصیت باکتریسایدی هر دوی آنها می گردد(۲۳). با توجه به وجود

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 9:03 +0430 on Thursday June 21st 2018

مقادیر بیشتری از این عناصر فرار در چای سیاه اثر ممانعت از تشکیل بیوفیلم توسط عصارهٔ چای سیاه منطقی به نظر می‌رسد.

از بین باکتری‌های مورد آزمایش، جنس کلبسیلا به علت داشتن پوشش ضخیم کپسولی و ناتراوایی بیشتری که نسبت به سایر باکتری‌های این خانواده دارد، مقاومت بیشتری از سایرین نشان داد، همان طور که در مقابل کلرامفنیکل نیز از مقاومت بالاتری برخوردار بود (جدول ۱). پروتئوس میرابیلیس دارای حساسیت بیشتری به چای سیاه بود و اشریشیا کلی انتروپاتوژن، نسبت به سایرین بیشترین حساسیت را به چای سبز داشت. سایر جنس‌های خانوادهٔ انتروباکتریاسه تقریباً حساسیت مشابهی در مقابل اثر ضد میکربی چای ازخود نشان دادند و با غلظت‌های تقریباً یکسانی رشدشان متوقف می‌شد که به دلیل شباهت ساختار دیواره و غشای باکتری‌های منسوب به یکدیگر در این خانواده می‌باشد.

یاماموتو و همکاران در سال ۱۹۹۷ بیان کردند که کاهش انتروباکتریاسه‌ها در روده باعث کاهش تولید آمونیاک، اسکاتول و آمین‌هایی می‌شود که در روده خاصیت سرطان‌زایی دارند(۲۴). از آنجا که دستگاه گوارش به طور زیادی تحت تاثیر نوشیدنی‌های وارده به بدن قرار می‌گیرد و غلظت بالایی از چای مصرفی وارد روده می‌شود احتمالاً کاهش تعداد انتروباکتریاسه‌ها در روده، باعث آزاد شدن یکسری سایت‌ها می شود که باعث سهولت جایگزینی باکتری‌های دیگری از قبیل لاکتوباسیل‌ها و یا بیفیدوباکتریوم‌ها بجای انواع انتروباکتریاسه‌های ساکن رودهٔ انسان خواهد شد. از اینرو اثر ضد میکربی چای با تعدیل میکروفلور و کاهش فرآورده‌های سرطان‌زای حاصل از آنها، به صورت مستقیم در رابطه با کاهش سرطان روده است. مطالعاتی وجود دارد که نشان داده مصرف چای می‌تواند باعث اصلاح میکروفلور روده نیز گردد(۲۵). هم‌چنین ثابت شده که باکتری‌هایی مانند لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم، کمتر تحت تاثیر چای قرار می‌گیرند ولی باکتروئیدزها در مقابل متابولیت‌های پلی فنلی حاصل از چای، راحت تر از بین می‌روند(۲۶).

در این مطالعه حساسیت کلبسیلا نومونیه به عصاره‌ها خصوصاً عصارهٔ چای سیاه کاملاً مشهود بود، از اینرو با اثر عصاره‌های چای سیاه و سبز روی کلبسیلا نومونیه و کاهش تعداد این باکتری در مجاری گوارشی بدن، شانس استقرار آن در دستگاه تنفسی نیز کمتر شده و با کمتر جایگزین شدن کلبسیلا نومونیه در راههای هوایی برونش ها، شانس ابتلا به پنومونی کلبسیلایی به خصوص در افرادی که سیستم ایمنی آنها ضعیف شده است نیز تا حدی کاهش می‌یابد.

نتیجه گیری

با توجه به اثر باکتریسایدی عصاره‌های چای سیاه و سبز و جلوگیری از تشکیل بیوفیلم، می توان با استخراج مواد موثر ضد انتروباکتریایی آنها به خصوص مواد موجود در چای سیاه که قدرت بیشتری در ممانعت از تشکیل بیوفیلم دارد از قبیل پلی فنل‌هایی مانند تیافلاوین و تیاروبیجین، از تعداد انتروباکتریاسه‌ها علاوه بر مجاری گوارشی بدن به میزان زیادی در مواد غذایی نیز کاست و چون سلول‌های پلانکتونی بسیار آسیب پذیرتر از سلول‌های موجود در بیوفیلم می باشند استفاده از این مواد (پلی فنل‌ها و تانن‌ها) به عنوان نگهدارنده در صنایع غذایی و به صورت جایگزینی برای نگهدارنده‌های شیمیایی که دارای عوارض ناخوشایند طولانی مدت بر سلامت مصرف کنندگان می‌باشند، ضروری به نظر می‌رسد.

منابع

1. Koo MWL, Cho CH. Pharmacological effects of green tea on the gastrointestinal system. European Journal of Pharmacology 2004; 500: 177-185.
2. Wheeler SR. Tea and Tannins. Science 1976; 204: 6-8.
3. Wiseman SA. Antioxidants in tea. Critical Review in Food Science and Nutrition 1997; 37: 705 – 718.

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 9:03 +0430 on Thursday June 21st 2018

4. Hamilton JM. Anticarcinogenic properties of tea (Camellia sinensis). Journal of Medical Microbiology 2001; 50: 299 – 302.
5. Anonymous. Using Tea to fight Typhoid. Tea and Coffee Journal 1923; p.129.
6. Ryu E. Prophylactic effect of tea on pathogenic microorganism infection to human and animals. International Journal of Zoonosis1980; 7: 164-170.
7. Ryu E, Blenden DC, Wendall D. The inhibition growth of selected bacteria by incorporating powdered tea in the medium. International Journal of Zoonosis 1982; 9: 73-76.
8. Scalbert A. Antimicrobial properties of tannins. Phytochemistry Journal 1991; 30: 3875-83.
9. Hamilton JMT. Antimicrobial properties of tea (Camellia sinensis). Antimicrobial agents and chemotherapy Journal 1995; p.2375-2377.
10. Toda M, Okubo S, Hiyoshi R, Shimamura T. The bactericidal activity of tea and coffee. Letters in Applied Microbiology 1989; 8: 123-125.
11. Toda M, Okubo S, Hara Y, Shinamura T. Antibacterial and bactericidal activities of tea extracts and catechins against methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Japanese Journal of Bacteriology 1991; 46: 839-845.
12. An BJ, Kwak JH, Son JH, Park JM, Lee JY, Jo C, Byun MW. Biological and antimicrobial activity of irradiated green tea polyphenols. Food Chemistry Journal 2004; 88(4): 549- 555.
13. Horiuchi Y, Toda M, Okubo S, Hara Y, Shimamura T. Protective activity of tea and catechins against Bordetella pertussis. Journal of Japanese Association Infection Disease 1992; 66: 599–605.
14. Ahn YJ, Kawamura T, Kim M, Yamamoto T, Mitsuoka T. Tea polyphenols: selective growth inhibitors of Clostridium spp. Agriculture Biological Chemistry Journal 1991; 55:1425-1426.
15. Hara Y, Ishigami T. Antibacterial activities of tea polyphenols against foodborne pathogenic bacteria. Journal of Japanese Society Food Sciences and Technology 1989; 36: 996-999.
16. Jawets A, Melnick J, Adelberg EA. Review of Medical Microbiology. 17th Edition. New york: A Lange Medical book, Appleton & Lange; 1998. p. 264-266.
17. Health Protection Agency. Susceptibility testing. National Standard Method 2006; BSOP 45: (Issue 2): 312.
18. Hood JR, Cavanagh JM, Heather MA. Evaluation of common antibacterial screening methods utilized in essential oil research. Journal of Essential Oil Research 2003; 20: 3.
19. Hattori M, Cusumoto IT, Namba T, Ishigami T, Hara Y. Effect of tea polyphenols on glucan synthesis by glucosyltransferase from Streptococcus mutans. Journal of Chemical Pharmacology 1990; 38: 717- 720.
20. Fukai A, Ishigami T, Hara Y. Antibacterial activity of tea polyphenols against phytopathogenic bacteria. Agriculture Biological Chemistry Journal 1991; 55: 1895-1897.
21. Stagg GV. Tea- Elements of a cuppa. Nutrition Bulletin 1980; 29: 233-245.
22. Kubo I, Muroi H, Himejima M. Antimicrobial activity of green tea flavor components and their combination effects. Journal of Agricultural Food Chemistry1992; 40: 245- 248.
23. Muroi H, Kubo I. Combination effects of antibacterial compound in green tea flavor against Streptococcus mutans. Journal of Agricultural Food Chemistry 1993; 41: 1102-1105.
24. Graham HN. Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. Preview Medicine Journal 1992; 21: 334-350.
25. Weisburger JH. Tea and Health: The underlying mechanism. Proc Soc Exp Biol Med 1999; 220: 271-275.
26. Lee HC, Jenner AM, Low CS, Lee YK. Effect of tea phenolics and their aromatic fecal bacterial metabolites on intestinal microbiota. Research in Microbiology Journal 2006; 157: 876-884.

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 9:03 +0430 on Thursday June 21st 2018

Comparing Black and Green tea (Camellia sinensis L) extracts effects on the growth inhibition and biofilm formation of Enterobacteriacea

Shoae Hassani AR[1], Ordouzadeh N[2], Ghaemi A[3*], Nazari R[4], Hamdi K[2], Hekmatpou D[5]

Abstract

Introduction: Extracts of leaves from Camellia sinensis L contains polyphenolic components with antimicrobial activity. In this investigation biofilm inhibitory effects of black and green tea extracts were defined for five members of enterobacteriacea family including: Enteropathogenic Escherichia coli, Shigella flexneri, Proteus mirabilis, Klebsiella pneumoniae and Salmonella enterica serovar Typhimurium. Because tea is the most widely drunk beverage in Iran, therefore investigation of its effects on enterobacterial biofilm formation and colonization is very important.

Materials and Methods: In this experimental study after extraction of samples with Soxhlet extractor in water/ methanol solution, further extraction took place in Ethyl acetate phase. The extracts preserved in 4°C refrigerator after sterilization by 0.44 µ filters. Well diffusion (Kirby Bauer) and broth dilution methods were used for evaluation of minimum inhibitory concentration of biofilm formation in black and green tea extracts treated cultures. Evaluation of biofilm formation was assayed by observation of colony forming unit of cultured bacteria per milliliter by sampling from Erlenmeyer flask wall scratching onto Tripticase soy agar medium and comparing the results with controls. Analysis of data was done using analysis of variance.

Results: Biofilm inhibitory effects of black tea were greater than green tea. The concentration of 4.5 mg/ml of black tea and 5mg/ml of green tea had bactericidal effects against examined bacteria. On Mueller Hinton agar, Proteus mirabilis was more sensitive to black tea; EPEC was more sensitive to green tea and Klebsiella pneumoniae showed more resistance to both extracts.

Conclusion: Due to the fact that gastrointestinal tract is directly affected with consumed beverage, the high concentration of tea entered in lumen can reduce the number of enterobacteriaceae and can reduce their carcinogenic amine products. Thus it plays an important role in inhibition of gastrointestinal lymphoma and colon carcinoma. Also application of tea polyphenols as a food preservative can be useful.

Key words: Camellia sinensis, Biofilm, formation, Enterobacteriaceae, antimicrobial, effect

*Corresponding author;
Email: ghaem_amir@yahoo.com
Address: Department of biology, Grgan University of medical sciences (phalsaphi foundation), Gorgan, Iran.
PO Box: 49175-1141

[1]- Student of PhD of microbiology, department of biology, Sciences and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran (scientific member of Grgan University of medical sciences).
[2] -MSc of microbiology, department of biology, Sciences and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
[3]- Student of PhD of virology, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran (scientific member of Grgan University of medical sciences).
[4]- Student of PhD of biophysics, department of biology, Sciences and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
[5] -Student of PhD of nursing, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran (scientific member of Arak University of medical sciences).