

مقایسه اثرات چای سیاه و چای سبز بر رشد و تشکیل بیوفیلیم در میکروارگانیسم های خانواده انتروباکتریاسه

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

۱- دانشجوی دکتری 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 دکتری 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 دکتری 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 میکروبی می باشد. از آنجا که چای از نوشیدنی های بسیار پرطرفدار در ایران می باشد لذا تاثیر آن بر تشکیل بیوفیلیم و کلونیزه شدن عوامل ایجاد عفونت های روده ای و عفونت های فرصت طلب بیمارستانی اهمیت زیادی دارد. هم چنین با جدا کردن ترکیبات بازدارنده تشکیل بیوفیلیم می توان از آنها به عنوان نگهدارنده مواد غذایی در صنایع استفاده نمود. در این پژوهش اثر ممانعت کنندگی عصاره های چای سیاه و سبز از تشکیل بیوفیلیم، در ۵ باکتری از خانواده 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 عصاره گیری نمونه ها توسط عصاره گیر Soxhlet با استفاده از حلال متانول ۵۰ درصد و جدا نمودن مجدد در فاز اتیل استات، عصاره ها پس از استریل شدن توسط فیلتر ۰/۴۴ میکرون تا زمان استفاده در یک فنانل استریل در ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. از روش انتشار چاهک (طبق روش کربی بائر) برای محاسبه حداقل غلظت بازدارندگی و از روش تهیه رقت در محیط مایع برای بررسی تشکیل بیوفیلیم در کشت های تیمار شده با غلظت های مختلف عصاره ها استفاده شد. ارزیابی تشکیل بیوفیلیم با نمونه برداری از جدار ارلن مایر حاوی محیط های تیمار شده و کشت آن روی تریپتیکاز سوی آگار و شمارش کلنی ها و سپس مقایسه آن با کشت های شاهد صورت گرفت. تحلیل آماری داده ها با آنالیز واریانس انجام شد.

نتایج: اثر ممانعت کنندگی از تشکیل بیوفیلیم در چای سیاه بیشتر از چای سبز بود. غلظت ۴/۵ میلی گرم در میلی لیتر از عصاره چای سیاه و ۵ میلی گرم در میلی لیتر از عصاره چای سبز، اثر باکتریاسیدی بر این میکروارگانیسم ها داشت. در میان این باکتری ها پروتئوس میرابیلیس بیشترین حساسیت به چای سیاه و اشریشیا کلی انتروپاتوژن بیشترین حساسیت را به چای سبز داشتند و کلبسیلا نومونیه بیشترین مقاومت را نسبت به هر دوی این عصاره ها نشان داد.

نتیجه گیری: از آنجا که چای به طور مستقیم پس از نوشیدن بر دستگاه گوارشی تاثیر می گذارد، منجر به کاهش انتروباکتریاسه ها و کاهش کلونیزاسیون آنها بر سطح سلول های اپی تلیال دستگاه گوارشی، کاهش خطر عفونت های روده ای و کاهش تولید مواد سرطان زا از قبیل اسکاتول در اثر متابولیسم این باکتری ها در روده می شود. هم چنین می توان از پلی فنل های چای به عنوان نگهدارنده مواد غذایی در صنایع نیز بهره گرفت.

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

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

شناسی، صندوق پستی ۴۹۱۷۵-۱۱۴۱

Email: ghaem_amir@yahoo.com

مقدمه

چای مانند قهوه در ردیف رایج‌ترین و مهم‌ترین نوشابه‌های مطبوع و مورد مصرف در جهان می‌باشد. چای سبز از برگ‌های جوان گیاه کاملیاسینسیس^۱ 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 اجازه فعالیت بیشتری داده شود و درجه حرارت تخمیر نیز افزایش یابد، چای سیاه حاصل می‌شود (۱). مجموعه پلی فنل‌های اکسیده شده چای را تانن می‌نامند که به طور کل با سایر تانن‌های گیاهی متفاوت است (۲). چای نوشیدنی پر طرفداری است که در کشورهایمانند 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، تیائین 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 کارگیری 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 در شرایط آزمایشگاه و بدن و شرایط آزمایشگاه در آن دوران وجود دارد ولی تمام آنها سطحی، گذرا و مقطعی بودند (۶-۸) تا این که در دهه 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 متی‌سیلین 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). یافته مشابهی هم در مورد بوردتلا پرتوسیسی (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 سویه‌ها و منابع چای‌های مورد استفاده می‌باشد (۱۵).
انتروباکتریاسه شایع‌ترین گروه از باسیل‌های گرم منفی شناسایی شده از نمونه‌ها 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 تازه‌های پیرامونی هستند. برای تمایز

¹ - Camellia sinensis.

براث به همراه ۰/۵ درصد عصاره 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 هیتون آگار (دیفکو، فرانسه) استفاده گردید. کشت سویه ها جهت تعیین CFU/ml^۱ قبل و بعد از اثر عصاره ها روی محیط تربیتیکاز سوی آگار صورت گرفت.

برگ های تازه، لطیف و سبز چای به صورت دوغنچه ای پس از برداشت شدن از بوته ها، در محل برداشت مالش داده شده و تحت حرارت ملایمی قرار گرفتند تا دچار تخمیر آنزیمی نگردند. سپس در کیسه های استریل حمل نمونه به آزمایشگاه میکرب شناسی دانشگاه علوم و تحقیقات تهران انتقال یافتند. این برگ های سبز خشک شده و مالش یافته، آسیاب شدند و عصاره گیری با استفاده از ۵ گرم نمونه مورد نظر در ۱۰۰ میلی لیتر مخلوط ۵۰ درصدی آب و متانول به عنوان حلال، در دستگاه عصاره گیر Soxhlet انجام گردید و عصاره سبز تیره ای از آن به دست آمد که دوباره توسط فاز اتیل استات جدا گردید، از نمونه چای سیاه خریداری شده هم به همین صورت عمل عصاره گیری انجام شد و عصاره ها پس از فیلتر شدن توسط فیلتر ۰/۴۴ میکرون تا زمان استفاده در یک فائل استریل، در یخچال ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

برای سنجش تاثیر ضد باکتریایی عصاره های چای سیاه و سبز، از روش انتشار چاهک (کربی - بائر^۲) استفاده شد (۱۷). چاهک هایی با قطر ۵ میلی متر روی پلیت های مولر هیتون آگار ایجاد شد و به ۵۰ میکرو لیتر از عصاره های با غلظت ۱۰۰ میلی گرم در میلی لیتر چای سبز و سیاه آغشته گردید تا غلظت نهایی ۵ میلی گرم در میلی لیتر حاصل شود. از کشت ۵ ساعته باکتری های مورد نظر در محیط نوترینت براث حاوی ۰/۱ درصد گلوکز و ۰/۵ درصد عصاره مخمر،

گونه های مختلف انتروباکتریاسه می توان به سادگی از محیط های بیوشیمیایی استفاده کرد. علائم بیماری که توسط خانواده انتروباکتریاسه ایجاد می شود به مکان عفونت بستگی دارد، شایع ترین بیماری های ایجاد شده توسط این باکتری ها شامل عفونت مجرای ادراری، بیماری های اسهالی، تب روده ای، انترکولیت، عفونت خون، مننژیت و پنومونی می باشد (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 بیوتیک ها دارد، صورت نگرفته است و از آنجا که استفاده از نگهدارنده های مواد غذایی در صنایع، جهت جلوگیری از فساد میکربی، علاوه بر هزینه های زیادی که دارند، عوارض نامطلوب و اثرات زیان باری بر سلامت انسان نیز می گذارند، لذا یافتن فرآورده های طبیعی مانند مشتقات چای، که فاقد عوارض جانبی و مخاطرات برای سلامت انسان باشند ضروری به نظر می رسد.

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 عصاره چای سبز و چای سیاه و همچنین اثر آنها بر تشکیل بیوفیلم، سویه های استاندارد اشریشیا کُلی انتروپاتوژن PTCC 1271، پروتئوس میرابیلیس PTCC 1077، کلبسیلا نومونیه ATCC 12658، سالمونلا انتریکا سرووار تیفی موروم ATCC 14028 و شیگلا فلکسنری PTCC 1234، تهیه شده از بانک میکربی مرکز رفرانس میکرب شناسی ایران مورد آزمایش قرار گرفتند. جهت کشت اولیه سویه ها از نوترینت

¹ - Coloni Forming Umt/ millilitre.

² - Kirby Bauer.

کلنی‌های موجود بر سطح دیواره ارلن و مقایسه آمار آن با کشت‌های جداریه 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 مرحله 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 منطقه مهار رشد برای اشیریشیا کلی انتروپاتوزن 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 نمونه کنترل مثبت یعنی آنتی بیوتیک کلرامفنیکل ۵ میکروگرم که هاله‌های عدم رشدی به اندازه ۲۵ میلی‌متر در اشیریشیا 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. عصاره چای سبز نیز در MIC برابر با ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر دارای فعالیت ضد باکتریایی بود که البته تاثیر آن مقداری کمتر از اثر چای سیاه بود. ناحیه ممانعت از رشد در این غلظت از عصاره چای سبز به ترتیب برای اشیریشیا 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 جداریه داخلی ارلن‌های حاوی اشیریشیا کلی انتروپاتوزن و سالمونلا انتریکا سرووار تایفی موریوم پس از ۱۰ ساعت و در سایر ارلن‌هایی

توسط سواب بر روی محیط‌های مولر هیتتون آگار، کشت پر داده شد و تا حصول نتیجه، به مدت ۱۸ ساعت در ۳۵ درجه 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)^۱ به عنوان کمترین غلظتی که قادر به مهار هرگونه رشد قابل مشاهده است با اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد باکتری‌ها در اطراف چاهک حاوی عصاره‌های مورد استفاده، تعیین گردید. در مرحله بعد ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون حاوی 10^7 CFU/ml از باکتری‌های مورد آزمایش وارد ارلن‌های حاوی ۹ میلی‌لیتر محیط نوترینت برآش شدند که در نهایت حاوی غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر 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 زنده آن محاسبه گردیده و نمودار مربوط به آن رسم گردد. جهت بررسی اثر این عصاره‌ها بر تشکیل بیوفیلم توسط میکروارگانیسم‌های مورد آزمایش از روش تهیه رقت در محیط مایع استفاده شد (۱۸). از کشت ۱۸ ساعته میکروارگانیسم‌های مورد نظر در محیط نوترینت برآش، به کمک اسپکتروفوتومتر Shimadzo UV 120-01 سوسپانسیون‌هایی با غلظت 10^7 CFU/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 برآش غنی شده با ۰/۱ درصد گلوکز و ۰/۵ درصد عصاره مخمر بودند. این ارلن‌ها در ۳۷ درجه 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 جداریه ارلن مایر برای مشاهده در زیر میکروسکوپ نوری و کشت نمونه در محیط تریپتیکاز سوی آگار جهت شمارش

¹ - Minimum Inhibitor Concentration.

مولر هیتون آگار متابعت می‌کرد به طوری که ۱۰ دقیقه پس از تلقیح به محیط نوترینت برات حاوی ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره چای سیاه، تعداد کلسیلا نومونیه به $10^4 \times 14/5$ CFU/ml و پروتئوس میرابیلیس به $10^4 \times 15/6$ 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 بازبایی نبودند. در همین غلظت از عصاره چای سبز، ۱۰ دقیقه پس از تلقیح تعداد کلسیلا نومونیه به $10^4 \times 19$ و اشریشیا گلی به $10^4 \times 16/5$ 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 ارگانیزم‌ها به صفر رسید. مقایسه بین اثرات عصاره‌های چای سیاه و سبز ۶۰ دقیقه پس از تیمار در نمودار ۳ دیده می‌شود.

بحث

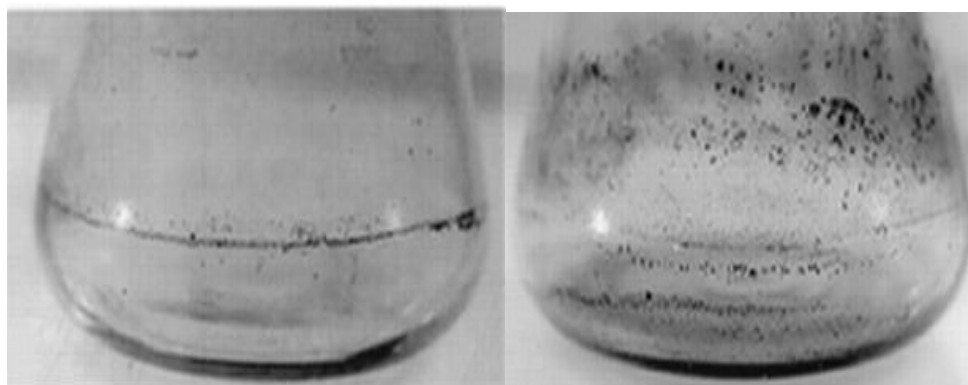
چای را که به مقدار زیادی به صورت روزمره به مصرف می‌رسد می‌توان برای مقاصد پزشکی هم مورد استفاده قرار داد. در سال ۱۸۸۹ هارا و ایشی گامی ادعا نمودند که سالمونلا تایفی موریوم و کمپیلوباکتر ججونی به چای مقاومند (۱۵) ولی سایر محققان گزارش کردند که این گونه‌ها هم به چای حساس می‌باشند (۷، ۱۰) احتمالاً جهش‌هایی 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 می‌کند. غلظت ۴/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از عصاره چای سیاه و ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر چای سبز باعث توقف رشد تمام گونه‌های باکتریایی مورد آزمایش گردید.

که فاقد هرگونه عصاره چای بود پس از ۱۸ ساعت کاملاً واضح بود. در روز سوم در تمام ارلن‌های حاوی ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از عصاره‌های چای سبز و سیاه تشکیل بیوفیلم به وضوح دیده شد. در ارلن‌های حاوی غلظت ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از عصاره چای سبز، در روز پنجم تشکیل بیوفیلم مشهود بود ولی در مورد ارلن‌های حاوی همین غلظت عصاره چای سیاه، بیوفیلم در روز دهم دیده شد (شکل ۱). غلظت ۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از عصاره چای سیاه و ۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از عصاره چای سبز اثر بازدارندگی کامل بر تشکیل بیوفیلم داشت و در ارلن‌های حاوی غلظت ۴/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره چای سیاه و ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره چای سبز، رشد باکتری‌ها دیده نشد و عصاره‌ها در این غلظت اثر باکتریاسیدی از خود نشان دادند ولی اگر به محیطی که حاوی بیوفیلم بالغ این میکروارگانیزم‌ها 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 میلی‌لیتر از عصاره چای سیاه و ۹ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره چای سبز می‌توانست روی بیوفیلم این باکتری‌ها اثر کرده و از گسترش آنها جلوگیری کند.

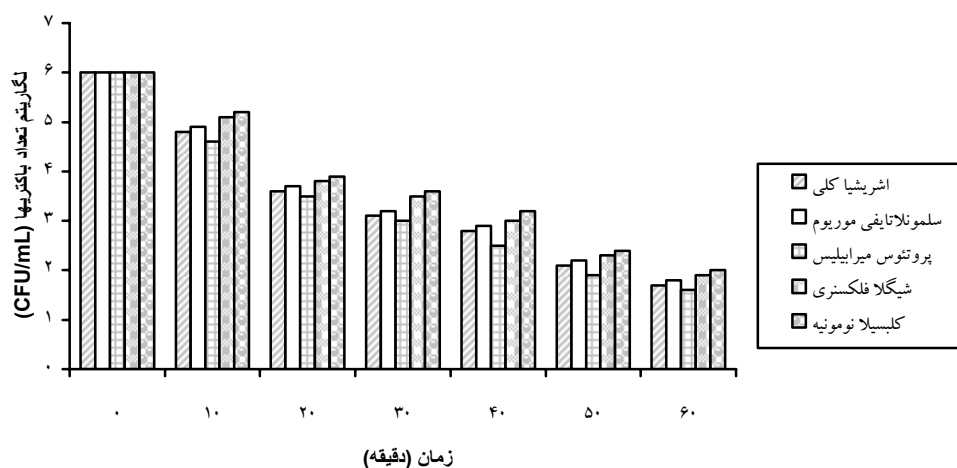
یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون حاوی CFU/ml 10^7 از هر کدام از جنس‌های باکتریایی مورد آزمایش که وارد ۹ میلی‌لیتر از محیط نوترینت برات حاوی ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از عصاره‌های چای سیاه و سبز (غلظت نهایی CFU/ml 10^6) شده بود، در فواصل ۱۰ دقیقه‌ای نمونه‌برداری گردیده و روی محیط تریپتیکاز سوی برات کشت داده شد و تعداد باکتری‌های زنده محاسبه گردید که نمودارهای مربوط به آنها در نمودارهای ۱ و ۲ دیده می‌شود. کاهش تعداد باکتری‌ها از الگوی MIC آنها روی پلیت‌های

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

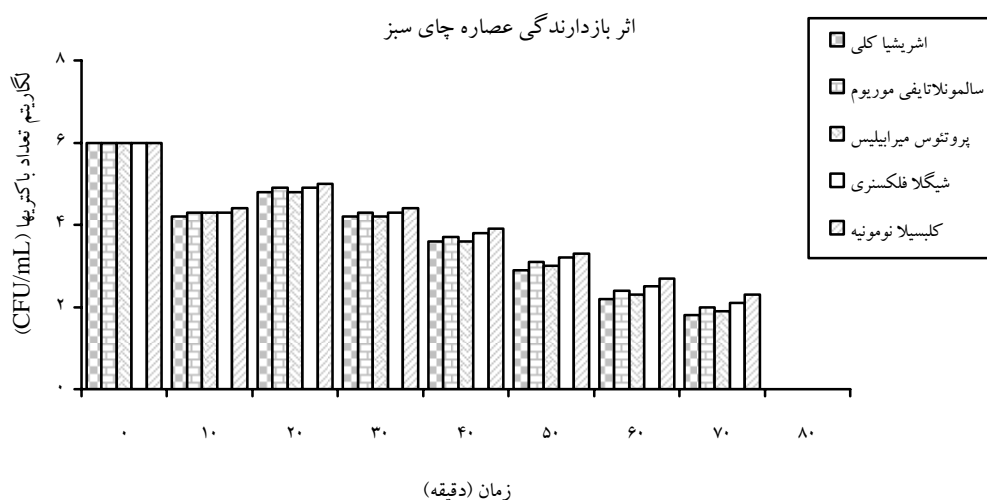
ناحیه ممانعت از رشد (میلی متر)		میکروارگانیزم	
کلرامفنیکل ۵ میکروگرم	عصاره چای سیاه ۵ میلی گرم / میلی لیتر	عصاره چای سبز ۵ میلی گرم / میلی لیتر	
۲۵	۲۳	۱۶,۵	اشریشیا کلی انتروپاتوژن PTCC 1271
۲۷	۱۹	۱۶	سالمونلا تاییفی موریوم ATCC 14028
۲۵	۱۷	۱۵,۵	شیگلا فلکسنری PTCC 1234
۲۴	۱۵	۱۴	کلبسیلا نومونیه ATCC 12658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



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



نمودار ۱. اثر ضد باکتریایی عصاره چای سیاه در غلظت ۵ میلی گرم در میلی لیتر (تعداد باکتریها در دقیقه صفر برابر 10^6 CFU/ml می باشد).



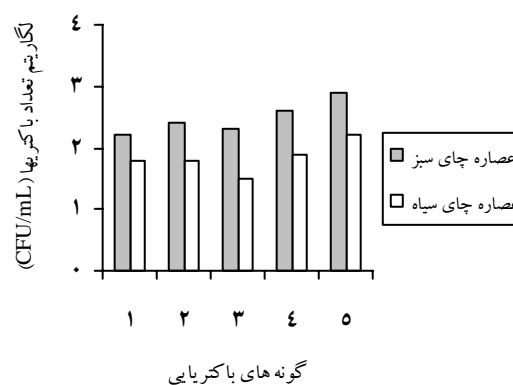
نمودار ۲. اثر ضد باکتریایی عصاره چای سبز در غلظت ۵ میلی گرم در میلی لیتر (تعداد باکتری‌ها در دقیقه صفر برابر 10^6 CFU/ml می‌باشد).

تیافلارین مانند کاتچین‌ها بوده و از اینرو دارای خاصیت ضد میکروبی بالایی می‌باشد.

اجزای فرار طعم دهنده چای نیز که به مقدار کمی وجود دارند ۱۰ تا ۲۰ قسمت در میلیون (PPm)، دارای خاصیت ضد میکروبی هستند و چون این اجزاء در چای سیاه بسیار بیشتر از 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 باکتری‌هایی که در غلظت‌های پایتیر 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 دهنده 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). موری و کوبو در سال ۱۹۹۳ نشان دادند که ترکیبی از عناصر طعم دهنده چای، به خصوص اندول به همراه ترپن‌ها باعث تقویت خاصیت باکتریاسیدی هر دوی آنها می‌گردد (۲۳). با توجه به وجود

مقایسه اثر چای سبز و سیاه بر بیوفیلم باکتریایی پس از یکساعت



نمودار ۳. مقایسه اثر عصاره‌های چای سیاه و سبز پس از ۶۰ دقیقه در غلظت ۵ میلی گرم در میلی لیتر (تعداد باکتری‌ها در دقیقه صفر برابر 10^6 CFU/ml می‌باشد). گونه‌های باکتریایی عبارتند از ۱- اشریشیا کلی ۲- سالمونلاتایفی 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 دهنده فعالیت ضد میکروبی بیشتر تیافلارین و تیاروبیجینی است که در چای سیاه در اثر اکسید 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

باکتریوئیدها در مقابل متابولیت‌های پلی فنلی حاصل از چای، راحت تر از بین می‌روند (۲۶).

در این مطالعه حساسیت کلبسیلا نومونیه به عصاره‌ها خصوصاً عصاره 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 برونش‌ها، شانس ابتلا به پنومونی کلبسیلابی به خصوص در افرادی که سیستم ایمنی آنها ضعیف شده است نیز تا حدی کاهش می‌یابد.

نتیجه گیری

با توجه به اثر باکتریاسیدی عصاره‌های چای سیاه و سبز و جلوگیری از تشکیل بیوفیلیم، می‌توان با استخراج مواد موثر ضد انتروباکتریایی آنها به خصوص مواد موجود در چای سیاه که قدرت بیشتری در ممانعت از تشکیل بیوفیلیم دارد از قبیل پلی فنل‌هایی مانند تیافلاوین و تیاریوجین، 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 بیوفیلیم می‌باشند 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.

مقادیر بیشتری از این عناصر فرار در چای سیاه اثر ممانعت از تشکیل بیوفیلیم توسط عصاره 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 اشیشیا کلی انتروپاتوژن، نسبت به سایرین بیشترین حساسیت را به چای سبز داشت. سایر جنس‌های خانواده انتروباکتریاسه تقریباً حساسیت مشابهی در مقابل اثر ضد میکربی چای از خود 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 می‌شود که باعث سهولت جایگزینی باکتری‌های دیگری از قبیل لاکتوباسیل‌ها و یا بیفیدوباکتریوم‌ها بجای انواع انتروباکتریاسه‌های ساکن روده 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

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 Zoonosis* 1980; 7: 164-170.
7. Ryu E, Blendon 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 Chemistry* 1992; 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. *Preventive 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.

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

Shoae Hassani AR¹, Ordouzadeh N², Ghaemi A^{3*}, Nazari R⁴, Hamdi K², Hekmatpou D⁵

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 enterobacteriaceae 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 Trypticase 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).