

بررسی فعالیت ضدباکتریایی دمنوش‌های گیاهی تهیه شده با چای سیاه، سبز، به‌لیمو و نعناع علیه استافیلوکوکوس اورئوس، شیگلا دیسانتری و باسیلوس سرئوس به‌روش سطح پاسخ

فاطمه ولیان^۱، هادی کوهساری^{۲*}، ابوالفضل فدوی^۳

۱ دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، واحد آزادشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، آزادشهر، ایران

۲ استادیار، گروه میکروبیولوژی، واحد آزادشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، آزادشهر، ایران

۳ استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد آزادشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، آزادشهر، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۲/۱۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۹/۱۹

چکیده

دمنوش‌های گیاهی به دلیل خواصی که در سلامتی از خود نشان داده‌اند، به عنوان نوشیدنی‌های کاربردی محبوبیت پیدا کرده‌اند. هدف از مطالعه حاضر بررسی فعالیت ضدباکتریایی دمنوش‌های گیاهی تهیه شده با چای سیاه، سبز، به‌لیمو و نعناع به روش سطح پاسخ می‌باشد. چهار دمنوش گیاهی شامل چای سیاه، سبز، به‌لیمو و نعناع با سه غلظت ساکارز (۲، ۵ و ۸ درصد) شیرین شدند. فعالیت ضدباکتریایی محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ این دمنوش‌ها پس از ۴، ۷ و ۲۱ روز نگهداری، علیه استافیلوکوکوس اورئوس، شیگلا دیسانتری و باسیلوس سرئوس با روش چاهک مورد ارزیابی قرار گرفت. تاثیر غلظت ساکارز، زمان نگهداری و نوع گیاه بر فعالیت ضدباکتریایی دمنوش‌ها با روش سطح پاسخ آنالیز شد. نوع گیاه در فعالیت ضدباکتریایی دمنوش‌های گیاهی علیه هر سه باکتری مورد آزمون تاثیر معناداری نشان داد ($P < 0/001$). دمنوش تهیه شده با چای سبز با ۸ درصد ساکارز پس از ۲۱ روز نگهداری بیشترین فعالیت ضدباکتریایی علیه شیگلا دیسانتری نشان داد. دمنوش چای سبز شیرین شده با غلظت ۲ درصد ساکارز بعد از ۲۱ روز نگهداری بیشترین فعالیت ضدباکتریایی علیه استافیلوکوکوس اورئوس نشان داد. برای حصول به بیشترین فعالیت ضد باکتریایی علیه باسیلوس سرئوس تهیه دمنوش چای سبز با ۲ درصد ساکارز پس از ۷ روز نگهداری پیشنهاد می‌شود. مدل‌های پیشگویی به دست آمده توسط نرم افزار، مطلوب بودن و قابلیت ناوربری مدل‌ها را نشان داد. در بین دمنوش‌های تهیه شده، چای سبز بیشترین فعالیت ضدباکتریایی را علیه همه باکتری‌های مورد آزمون نشان داد.

کلمات کلیدی: فعالیت ضدباکتریایی، دمنوش گیاهی، غلظت ساکارز، زمان نگهداری، روش سطح پاسخ

* نویسنده مسئول: هادی کوهساری

آدرس: گروه میکروبیولوژی، واحد آزادشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، آزادشهر، ایران. تلفن: ۹۱۱۲۷۳۰۳۶۱

پست الکترونیک: Email: hadikoohsari@yahoo.com

مقدمه

اگرچه آنتی بیوتیکها مهمترین داروهای مورد استفاده در معالجه بیماریهای عفونی هستند ولی در سال های اخیر، مقاومت آنتی بیوتیکی رو به افزایش است و مقاومت های چند دارویی (Multi Drug Resistant (MDR) و ارگانسیم های مقاوم به همه آنتی بیوتیکها (Pan-Resistant Organisms) به یک مشکل جدی در کنترل بیماری های عفونی تبدیل شده است (۱۵ و ۱۱). عدم موفقیت آنتی بیوتیک های موجود در کنترل عفونت ها، پیدا کردن عوامل جایگزین با مکانیسم های عمل جدید و عوارض جانبی کمتر را مطرح می سازد. یکی از این استراتژی ها استفاده از ترکیبات ضد میکروبی طبیعی مانند محصولات گیاهی حاصل از گیاهان و از جمله دمنوش های گیاهی می باشد. از دمنوش های گیاهی علاوه بر خاصیت نوشیدنی آنها، برای درمان بیماری های انسانی در سراسر جهان استفاده می شود (۸).

بررسی عوامل ضد میکروبی طبیعی به عنوان جایگزینی برای همتایان مصنوعی، مورد توجه قابل توجه پژوهشگران و صنعت محصولات طبیعی قرار گرفته است. فرض بر این است که داروهای گیاهی نسبتاً مؤثر هستند و در مقایسه با اکثر داروهای شیمیایی از نظر عوارض جانبی بی خطر هستند (۱۸). یک بررسی سازمان بهداشت جهانی گزارش داده است که حدود ۷۰ تا ۸۰٪ از جمعیت جهان از داروهای گیاهی به عنوان مراقبت های بهداشتی اولیه خود استفاده می کنند (۲۰). تخمین زده می شود که از داروهای جایگزین یا گیاهی به جای داروی معمولی تقریباً ۳۰٪ از کل جمعیت ایالات متحده استفاده می کنند (۲۲).

بر اساس گیاه مورد استفاده، تهیه داروهای گیاهی متفاوت است و یکی از مهمترین راههای استفاده از

گیاهان دارویی استفاده از دمنوش های آنها (Hot teas) یا جوشانده (Boiled teas) آنها می باشد. نوشیدن دمنوش گیاهی به عنوان یک نوشیدنی لذت بخش و همچنین یک داروی گیاهی کارآمد مطرح می باشد. دمنوش های گیاهی به عنوان دارویی طبیعی و بدون نسخه در بعضی از کشورها از جمله کانادا به عنوان درمانی برای سوزش مخاطی دهان و حلق با سرفه خشک شناخته شده و مورد تأیید قرار گرفته اند (۲۶).

چای ها محصولات گیاه *Camellia sinensis* هستند و در نقاط مختلف دنیا بسته به فرآوری و درجه تخمیر به شکل چای سیاه، اولونگ و سبز مصرف می شوند. چای سیاه معمولاً بوسیله مردمان آمریکای شمالی و شمال آفریقا مصرف می شود و مردم چین، ژاپن و کره چای سبز را ترجیح می دهند. چای سبز و چای سیاه توسط بیش از دو سوم جمعیت جهان مصرف می شود و بدون شک دومین نوشیدنی بعد از آب است (۲۳ و ۱۰). به عنوان یک نوشیدنی، چای معمولاً با تزریق برگ *C. sinensis* در آب داغ تهیه می شود. این برگها حاوی تقریباً ۲۰۰۰ ماده شیمیایی مختلف فیتوشیمیایی مانند ترکیبات فنولیک، متیل زانتین، کربوهیدرات، پروتئین، اسیدهای آمینه آزاد، L-آسکوربیک و سایر اسیدهای آلی، ترکیبات فرار، چربی ها، کاروتنوئیدها، کلروفیل ها، مواد معدنی و عناصر کمیاب هستند. پلی فنول ها به دلیل فراوانی نسبی بالاتر و خاصیت زیست فعال کننده مهمترین ترکیبات برگهای چای هستند (۱۷). برگهای چای سبز تازه سرشار از فلاوانول های مونومر هستند که تحت عنوان کاتچین نامیده می شوند (۳). کاتچین ها مهمترین ترکیبات موجود در چای هستند که اثرات بیولوژیک این گیاه به آنها مربوط می شود. چای و اجزای آن حاوی بسیاری از مزایای مختلف فیزیولوژیکی و دارویی از جمله محافظت در

ضدباکتریایی محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ بر اساس انتشار در آگار و با روش چاهک انجام شد (۶).

آماده سازی سویه های باکتریایی مورد آزمون
سویه های باکتری های مورد آزمون شامل یک گونه باکتری گرم منفی شیگلا دیسانتری (PTCC 1188) و دو گونه باکتری گرم مثبت شامل استافیلوکوکوس اورئوس (PTCC 1112) و باسیلوس سرئوس (PTCC 1154) به صورت لیوفلیزه از سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران تهیه شدند و در آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد آزادشهر در محیط BHI و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد احیاء شدند. آنگاه چند کلنی یک دست از کشت ۲۴ ساعته هر باکتری به محیط کشت نوترینت براث تلقیح شد و در ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱ تا ۲ ساعت گرمخانه گذاری شد تا کدورتی معادل ۰/۵ مک فارلند $10^8 \times 1/5$ CFU/ml حاصل شود (۶).

ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی با روش چاهک
فعالیت ضد باکتریایی دمنوش های گیاهی (شیرین شده) بر اساس انتشار در آگار و با روش چاهک مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین منظور از تمامی سویه های باکتریایی سوسپانسیون باکتریایی معادل نیم مک فارلند ($10^8 \times 1/5$ CFU/ml) تهیه شد و از این سوسپانسیون بر سطح محیط کشت مولر هینتون آگار کشت یکنواخت تهیه شد. سپس با استفاده از چوب پنبه سوراخ کن چاهک هایی با قطر ۸/۲ میلی متر حفر گردید و از هر یک از دمنوش های گیاهی در چاهک ها ریخته و به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شد. پس از این مدت با اندازه گیری قطر هاله عدم رشد در اطراف چاهک ها حساسیت یا مقاومت باکتری های مورد آزمون تعیین شد (۶).

برابر بیماریهای قلبی عروقی، کنترل چاقی و دیابت، ضد التهاب، آنتی اکسیدان، ضد کلسترول، ضد باکتری ها، ضد سرطان و ضد قارچ و ضد ویروس را نشان می دهد (۲۱).

گیاهان دیگر مانند نعناع (۱۶) و به لیمو (۱۴) نیز دارای فعالیت ضد میکروبی و سایر مزایای سلامتی هستند. لذا در کنار چای سیاه و سبز که بطور رایج در همه جای دنیا استفاده می شود، استفاده از دمنوش های گیاهان دیگر همچون نعناع و به لیمو با توجه به ذائقه و سلیقه های مختلف می تواند استفاده شود. هدف از مطالعه حاضر بررسی فعالیت ضدباکتریایی دمنوش های گیاهی تهیه شده با چای سیاه، سبز، به لیمو و نعناع علیه استافیلوکوکوس اورئوس، شیگلا دیسانتری و باسیلوس سرئوس به روش سطح پاسخ می باشد.

مواد و روش ها

آماده سازی دمنوش های گیاهی

به لیمو (*Lippia citriodora*) از مزرعه تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی واحد آزادشهر، چای سبز و سیاه (*Camellia sinensis*) از باغهای چای شهرستان لاهیجان واقع در شمال ایران و نعناع (*Mentha piperita*) از مغازه گیاهان دارویی تهیه شدند. ۱ گرم از برگهای خشک شده هر یک از این گیاهان به همراه ۲، ۵ و ۸ گرم ساکارز در ۱۰۰ میلی لیتر آب جوشیده اضافه شد و برای دم کشیدن به مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه در دمای ۷۰ تا ۹۰ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. پس از این مدت دمنوش های گیاهی برای جدا شده برگ ها، با عبور دادن از گاز استریل، صاف شدند و پس از درب بندی با گاز استریل، در دمای اتاق نگهداری شدند. در بازه های زمانی ۷، ۱۴ و ۲۱ روز این دمنوش ها در ۵۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند و فعالیت

اندازه گیری pH

pH هر یک از دمنوش های گیاهی شیرین شده از زمان تهیه تا پایان زمان ۲۱ روز نگهداری، و در فواصل ۴۸ ساعته، با دستگاه pH متر کالیبره شده اندازه گیری شد. pH متر با محلول KCL با pH ۷،۱۰ و ۴ کالیبره شد.

طراحی آزمایشات و آنالیز آماری

در این تحقیق با استفاده از روش سطح پاسخ، با ۳ سطح مختلف غلظت ساکارز (۲، ۵ و ۸ درصد) و زمان ماندگاری (۷، ۱۴ و ۲۱ روز) و ۴ سطح برای نوع گیاه

$$x_i = (X_i - X_0) / \Delta X \quad (1)$$

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^2 \beta_i x_i + \sum_{i=1}^2 \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^3 \sum_{j=i+1}^3 \beta_{ij} x_i x_j \quad (2)$$

روش سطح پاسخ برای محاسبه قطر هاله عدم رشد، طبق رابطه (۲) توسط نرم افزار نام برده ارائه گردید.

علاوه بر این، تجزیه و تحلیل رگرسیون، اثرات مجزا و متقابل متغیرها و ضرایب تعیین نیز محاسبه شد. مدل های پیشگویی برای هر دمنوش گیاهی و هر باکتری، به

جدول ۱. مقادیر سطوح و کدهای متغیرهای مستقل مورد استفاده در مطالعه

| سطوح | | نشانهها | | | متغیرها | |
|------|----|---------|----|----|----------------|----------------|
| α+ | +۱ | ۰ | -۱ | α- | بدون کد | کد دار |
| ۸ | ۸ | ۵ | ۲ | ۲ | X ₁ | x ₁ |
| ۲۱ | ۲۱ | ۱۴ | ۷ | ۷ | X ₂ | x ₂ |

$$*x_1 = (X_1 - 5) / 3; x_2 = (X_2 - 14) / 7; \alpha = 1$$

سبز، نعناع و به لیمو (۳۶ تیمار) علیه استافیلوکوکوس اورئوس، شیگلا دیسانتری و باسیلوس سرئوس آمده است. نتایج فعالیت ضدباکتریایی بر اساس قطر هاله عدم رشد و میانگین سه تکرار می باشد. مقادیر پیش بینی شده حاصل از مدل های پیشگویی به دست آمده توسط نرم افزار نیز آمده است (جدول ۲).

نتایج

در جدول ۲ داده های خام به دست آمده شامل ۳۶ تیمار مربوط به تاثیر شرایط مختلف تهیه دمنوش های گیاهی یعنی ۳ سطح زمان ماندگاری (۷، ۱۴ و ۲۱ روز)، ۳ سطح غلظت ساکارز (۲، ۵ و ۸ درصد) بر فعالیت ضدباکتریایی چهار دمنوش گیاهی بر پایه چای سیاه،

جدول ۲. داده های خام به دست آمده (قطر هاله عدم رشد و pH) مربوط به تاثیر شرایط مختلف تهیه دمنوش های گیاهی بر فعالیت ضد باکتریایی علیه باکتری های مورد آزمون

| میانگین قطر هاله عدم رشد (میلیمتر)** | | | | | | pH | | نوع گیاه* | زمان نگهداری | غلظت ساکارز (٪) | شماره تیمار |
|--------------------------------------|--------------|----------------------|--------------|---------------------|--------------|---------------------|--------------|-----------|--------------|-----------------|-------------|
| باسیلوس سرئوس | | استافیلوکوکوس اورئوس | | شیگلا دیسانتری | | مقادیر پیش | مقادیر واقعی | | | | |
| مقادیر پیش بینی شده | مقادیر واقعی | مقادیر پیش بینی شده | مقادیر واقعی | مقادیر پیش بینی شده | مقادیر واقعی | مقادیر پیش بینی شده | مقادیر واقعی | | | | |
| ۰/۰۸ | ۰/۰۰ | ۷/۱۵ | ۹/۳۳ | ۱۴/۵۴ | ۱۱/۶۷ | ۵/۴۲ | ۵/۴۵ | BT | ۷ | ۲ | ۱ |
| -۰/۱۳ | ۰/۰۰ | ۲/۹۰ | ۰/۰۰ | ۱۵/۶۸ | ۱۸/۰۰ | ۵/۳۳ | ۵/۳۶ | GT | ۷ | ۲ | ۲ |
| ۰/۰۴ | ۰/۰۰ | ۴/۳۵ | ۰/۰۰ | ۱۸/۴۳ | ۱۶/۰۰ | ۵/۴۱ | ۵/۴۱ | LT | ۷ | ۲ | ۳ |
| ۰/۰۷ | ۰/۰۰ | ۷/۳۵ | ۱۱/۰۰ | ۸/۶۷ | ۱۵/۰۰ | ۵/۲۴ | ۵/۱۳ | PT | ۷ | ۲ | ۴ |
| -۰/۱۲ | ۰/۰۰ | ۵/۱۷ | ۱۱/۰۰ | ۱۰/۸۱ | ۱۵/۳۳ | ۵/۱۹ | ۵/۲۵ | BT | ۱۴ | ۲ | ۵ |
| ۰/۰۷ | ۰/۰۰ | ۸/۶۸ | ۹/۳۳ | ۱۴/۵۶ | ۹/۶۷ | ۵/۳۰ | ۵/۲۴ | GT | ۱۴ | ۲ | ۶ |
| ۰/۰۴ | ۰/۰۰ | ۴/۹۱ | ۰/۰۰ | ۸/۶۵ | ۰/۰۰ | ۵/۱۶ | ۵/۱۹ | LT | ۱۴ | ۲ | ۷ |
| -۰/۱۳ | ۰/۰۰ | ۴/۷۹ | ۰/۰۰ | ۱۱/۷۹ | ۱۵/۳۳ | ۵/۱۴ | ۵/۱۷ | PT | ۱۴ | ۲ | ۸ |
| ۰/۰۸ | ۰/۰۰ | ۱۰/۳۷ | ۱۵/۰۰ | ۱۶/۵۴ | ۱۸/۶۷ | ۵/۲۹ | ۵/۲۹ | BT | ۲۱ | ۲ | ۹ |
| ۱۰/۱۰ | ۱۱/۰۰ | ۱۹/۱۸ | ۲۰/۰۰ | ۲۰/۰۶ | ۱۹/۰۰ | ۵/۸۰ | ۵/۸۳ | GT | ۲۱ | ۲ | ۱۰ |
| ۹/۶۶ | ۹/۶۷ | ۱۳/۲۲ | ۱۸/۰۰ | ۱۸/۷۰ | ۱۸/۳۳ | ۵/۶۹ | ۵/۷۴ | LT | ۲۱ | ۲ | ۱۱ |
| ۹/۶۱ | ۸/۶۷ | ۱۲/۹۵ | ۱۶/۰۰ | ۱۸/۹۵ | ۲۱/۰۰ | ۵/۷۳ | ۵/۶۹ | PT | ۲۱ | ۲ | ۱۲ |
| ۱۰/۰۴ | ۸/۶۷ | ۲۱/۴۴ | ۱۴/۶۷ | ۱۷/۹۱ | ۱۸/۶۷ | ۵/۶۲ | ۵/۴۹ | BT | ۷ | ۵ | ۱۳ |
| ۹/۶۲ | ۹/۰۰ | ۱۷/۵۴ | ۱۵/۰۰ | ۱۷/۵۵ | ۱۵/۰۰ | ۵/۵۴ | ۵/۵۹ | GT | ۷ | ۵ | ۱۴ |
| ۹/۵۹ | ۱۱/۶۷ | ۱۹/۳۳ | ۱۱/۳۳ | ۱۸/۸۰ | ۱۹/۳۳ | ۵/۶۲ | ۵/۶۰ | LT | ۷ | ۵ | ۱۵ |
| ۹/۹۵ | ۱۱/۰۰ | ۲۱/۰۶ | ۲۴/۰۰ | ۲۱/۶۲ | ۲۴/۰۰ | ۵/۵۴ | ۵/۵۸ | PT | ۷ | ۵ | ۱۶ |
| ۹/۷۲ | ۱۰/۵۶ | ۱۹/۳۱ | ۱۶/۷۸ | ۱۹/۳۲ | ۱۹/۴۴ | ۵/۵۶ | ۵/۵۹ | BT | ۱۴ | ۵ | ۱۷ |
| ۹/۵۴ | ۹/۰۰ | ۲۳/۰۷ | ۲۵/۰۰ | ۲۴/۵۰ | ۲۴/۰۰ | ۵/۶۰ | ۵/۵۸ | GT | ۱۴ | ۵ | ۱۸ |
| ۰/۰۸ | ۰/۰۰ | -۰/۳۷ | ۰/۰۰ | ۱۳/۰۸ | ۱۴/۰۰ | ۶/۹۸ | ۶/۸۶ | LT | ۱۴ | ۵ | ۱۹ |
| -۰/۱۳ | ۰/۰۰ | -۲/۱۲ | ۰/۰۰ | ۱۱/۸۳ | ۱۳/۳۳ | ۶/۹۱ | ۷/۰۳ | PT | ۱۴ | ۵ | ۲۰ |
| ۰/۰۴ | ۰/۰۰ | ۱/۸۴ | ۰/۰۰ | ۱۲/۱۹ | ۱۲/۶۷ | ۷/۰۱ | ۶/۸۷ | BT | ۲۱ | ۵ | ۲۱ |
| ۰/۰۷ | ۰/۰۰ | ۳/۲۲ | ۰/۰۰ | ۱۱/۶۵ | ۱۳/۰۰ | ۷/۰۵ | ۷/۱۲ | GT | ۲۱ | ۵ | ۲۲ |
| -۰/۱۲ | ۰/۰۰ | ۳/۵۴ | ۰/۰۰ | ۱۱/۴۰ | ۰/۰۰ | ۷/۰۱ | ۶/۹۸ | LT | ۲۱ | ۵ | ۲۳ |
| ۰/۰۷ | ۰/۰۰ | ۹/۵۵ | ۱۵/۰۰ | ۱۲/۷۶ | ۱۷/۰۰ | ۷/۱۴ | ۷/۳۹ | PT | ۲۱ | ۵ | ۲۴ |
| ۰/۰۴ | ۰/۰۰ | ۴/۱۷ | ۱۱/۰۰ | ۱۶/۰۸ | ۱۸/۳۳ | ۷/۲۱ | ۷/۳۳ | BT | ۷ | ۸ | ۲۵ |
| -۰/۱۳ | ۰/۰۰ | ۶/۵۵ | ۰/۰۰ | ۱۶/۸۳ | ۱۷/۶۷ | ۷/۲۱ | ۶/۹۶ | GT | ۷ | ۸ | ۲۶ |
| ۰/۰۸ | ۰/۰۰ | ۱۴/۶۳ | ۱۵/۰۰ | ۱۹/۱۹ | ۱۹/۰۰ | ۷/۳۷ | ۷/۳۴ | LT | ۷ | ۸ | ۲۷ |
| ۰/۰۸ | ۰/۰۰ | ۵/۴۸ | ۰/۰۰ | ۱۹/۲۸ | ۱۸/۰۰ | ۶/۳۶ | ۶/۴۴ | PT | ۷ | ۸ | ۲۸ |
| -۰/۱۳ | ۰/۰۰ | -۰/۴۹ | ۰/۰۰ | ۱۶/۸۷ | ۱۷/۶۷ | ۶/۱۲ | ۶/۱۱ | BT | ۱۴ | ۸ | ۲۹ |
| ۰/۰۴ | ۰/۰۰ | -۰/۷۶ | ۰/۰۰ | ۱۶/۰۶ | ۱۶/۰۰ | ۶/۰۴ | ۶/۰۲ | GT | ۱۴ | ۸ | ۳۰ |
| ۰/۰۷ | ۰/۰۰ | ۱۳/۵۱ | ۱۹/۰۰ | ۱۵/۴۱ | ۱۵/۳۳ | ۶/۱۸ | ۶/۱۲ | LT | ۱۴ | ۸ | ۳۱ |
| -۰/۱۲ | ۰/۰۰ | ۹/۶۱ | ۱۱/۰۰ | ۱۳/۹۹ | ۱۵/۳۳ | ۵/۹۷ | ۵/۹۲ | PT | ۱۴ | ۸ | ۳۲ |
| ۰/۰۷ | ۰/۰۰ | ۱۱/۴۰ | ۱۳/۰۰ | ۱۴/۱۹ | ۱۴/۰۰ | ۵/۹۲ | ۵/۹۴ | BT | ۲۱ | ۸ | ۳۳ |
| ۰/۰۴ | ۰/۰۰ | ۱۸/۹۱ | ۱۷/۰۰ | ۱۷/۳۹ | ۱۷/۳۳ | ۶/۱۰ | ۶/۱۴ | GT | ۲۱ | ۸ | ۳۴ |
| -۰/۱۳ | ۰/۰۰ | ۱۷/۰۷ | ۱۹/۰۰ | ۱۶/۹۸ | ۱۷/۶۷ | ۵/۹۲ | ۵/۸۸ | LT | ۲۱ | ۸ | ۳۵ |
| ۰/۰۸ | ۰/۰۰ | ۲۰/۹۲ | ۱۶/۶۷ | ۱۸/۱۷ | ۱۷/۰۰ | ۵/۹۱ | ۵/۹۶ | PT | ۲۱ | ۸ | ۳۶ |

* BT: چای سیاه GT: چای سبز LT: چای به لیمو PT: چای نعناع
** میانگین سه تکرار

نوسانات pH در دمنوش های گیاهی

همانطور که در جدول ۳ مشاهده می شود متغیرهای مستقل غلظت ساکارز و زمان نگهداری بر تغییرات pH دمنوش ها تاثیر معناداری نداشته است ($P = 0/65$). ولی نوع چای بر نوسانات pH در دمنوش های مورد مطالعه تاثیرات معناداری داشته است ($P \leq 0.001$). و در بین نمونه ها، دمنوش تهیه شده با به لیمو دارای بیشترین pH بوده است. همچنین نوسانات دمنوش تهیه شده با به لیمو، هر چند اندک ولی بیش از بقیه دمنوش ها بوده است (شکل ۱). البته در مطالعه اثرات متقابل این متغیرها، اثرات متقابل زمان نگهداری با نوع چای در سطح ۹۵ درصد تاثیرات معناداری در نوسانات pH دمنوش های مورد مطالعه داشته است (جدول ۳).

تاثیر متغیرهای مستقل بر فعالیت ضد باکتریایی دمنوش های گیاهی شیرین شده علیه شیگلا دیسانتری

آنالیز تجزیه واریانس میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری شیگلا دیسانتری در مواجهه با دمنوش های گیاهی شیرین شده نشان داد که در بین متغیرهای مستقل، غلظت ساکارز و نوع چای به ترتیب در سطوح ۹۵ و ۹۹/۹ درصد بر فعالیت ضد باکتریایی دمنوش های گیاهی شیرین شده علیه شیگلا دیسانتری تاثیر معناداری را دارند. همچنین اثرات متقابل غلظت ساکارز با زمان نگهداری و غلظت ساکارز با نوع چای در سطوح ۹۵ درصد و زمان نگهداری با نوع چای در سطح ۹۹ درصد تاثیر معناداری داشته است (جدول ۳).

تاثیر متغیرهای مستقل بر فعالیت ضد باکتریایی دمنوش های گیاهی شیرین شده علیه استافیلوکوکوس اورئوس

آنالیز تجزیه واریانس میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در مواجهه با

دمنوش های گیاهی تهیه شده نشان داد که در بین متغیرهای مستقل به استثناء غلظت ساکارز، زمان نگهداری و نوع چای بر فعالیت ضد باکتریایی دمنوش های گیاهی شیرین شده علیه استافیلوکوکوس اورئوس تاثیر معناداری را دارند ($P < 0/001$). البته اثرات متقابل غلظت ساکارز با زمان نگهداری و غلظت ساکارز با نوع چای به ترتیب در سطوح ۹۹ و ۹۵ درصد و زمان نگهداری با نوع چای در سطح ۹۹/۹ درصد، اثرات معناداری بر فعالیت ضد باکتریایی دمنوش های گیاهی مورد مطالعه علیه باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس داشته اند (جدول ۳۴). در شکل ۳ می توان تاثیر مثبت افزایش زمان نگهداری را در افزایش فعالیت ضد باکتریایی دمنوش های گیاهی تهیه شده علیه باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس مشاهده کرد. به طوریکه این افزایش فعالیت ضد باکتریایی در دمنوش گیاهی تهیه شده بر پایه نعنای بسیار قابل توجه است. همچنین تاثیر متقابل غلظت ساکارز با زمان نگهداری در افزایش فعالیت ضد باکتریایی دمنوش تهیه شده با به لیمو علیه این باکتری گرم مثبت قابل مشاهده است (شکل ۳).

تاثیر متغیرهای مستقل بر فعالیت ضد باکتریایی دمنوش های گیاهی شیرین شده علیه باسیلوس سرئوس

در بررسی متغیرهای موثر در فعالیت های ضد باکتریایی دمنوش های گیاهی شیرین شده علیه باکتری گرم مثبت باسیلوس سرئوس نتایج تجزیه آنالیز واریانس جدول ۴ نشان داد که در بین متغیرهای مستقل، فقط نوع چای بر فعالیت ضد باکتریایی دمنوش های گیاهی شیرین شده علیه باسیلوس سرئوس تاثیر معناداری داشت ($P < 0/001$). همچنین اثرات متقابل متغیرهای مستقل

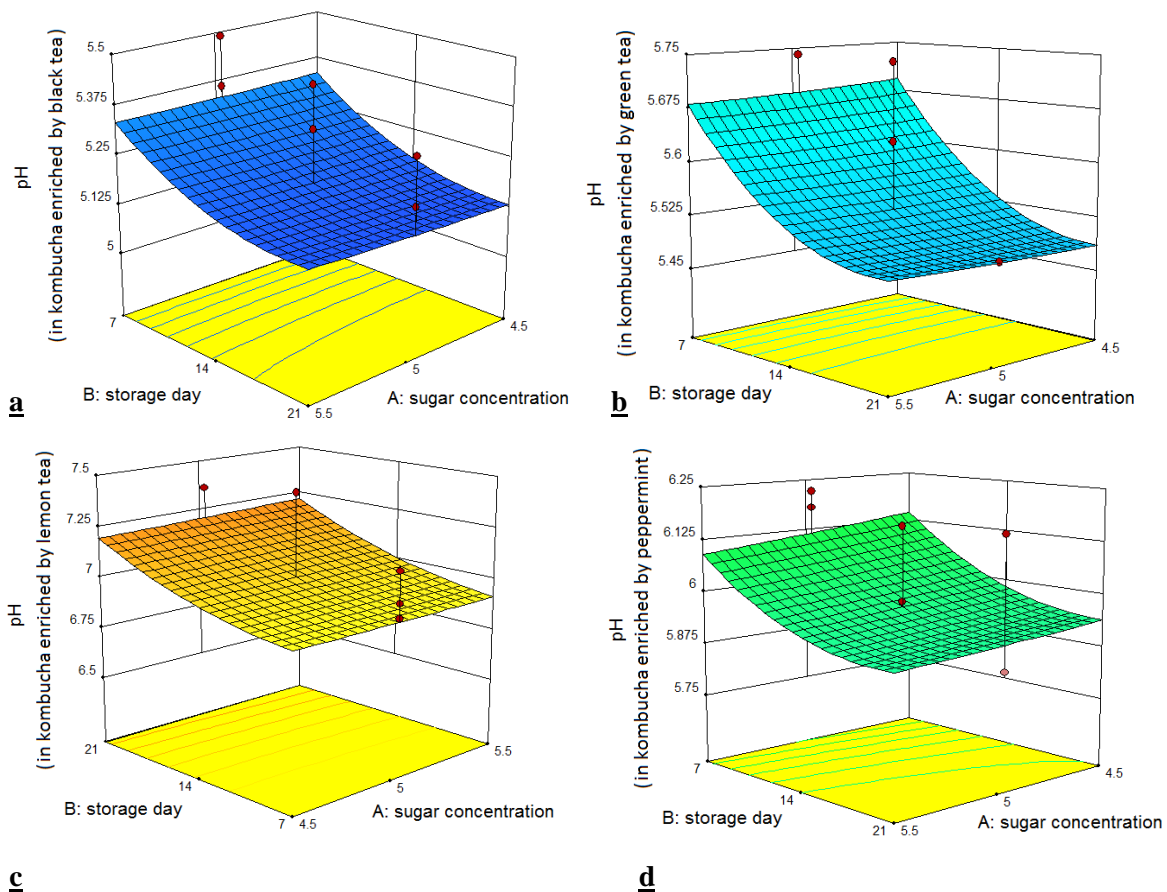
با توجه به تعاریف نرم افزار، مقادیر R-sq، Adj R-Sq، Adeq Precision و Pred R-Sq که در جدول ۳ آمده است حاکی از مطلوب بودن مدل هاست و قابلیت ناوبری مدل‌ها را برای همه باکتری‌های مورد آزمون نشان می‌دهد.

نیز تاثیر معناداری بر فعالیت ضدباکتریایی دمنوش‌های گیاهی علیه باسیلوس سرئوس نداشته‌اند (جدول ۳). در بین دمنوش‌های گیاهی تولید شده، دمنوش تهیه شده با چای سبز بیش از دیگر دمنوش‌ها دارای فعالیت ضدباکتریایی علیه باسیلوس سرئوس بوده است (شکل ۴).

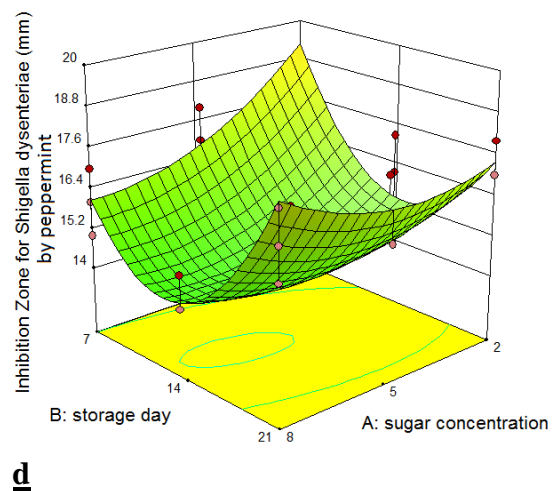
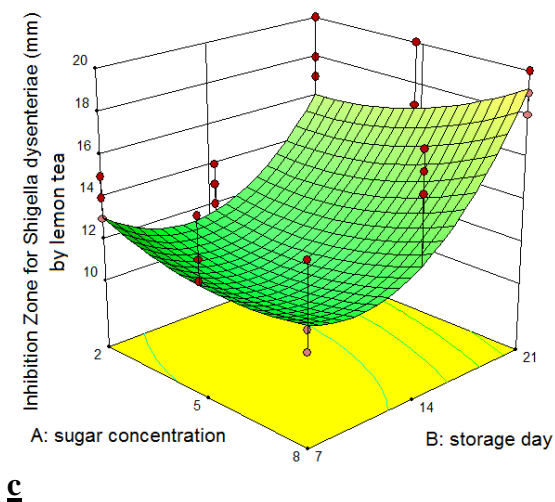
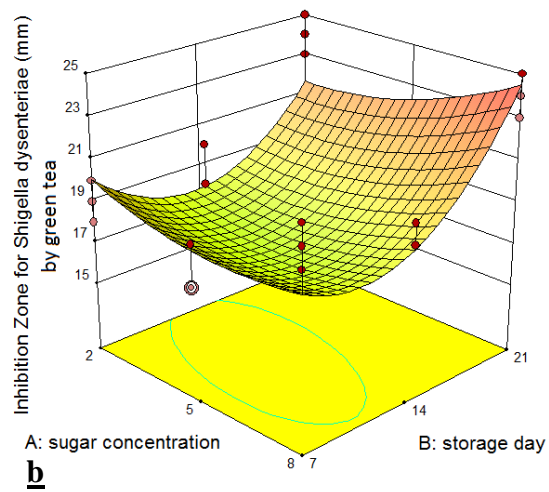
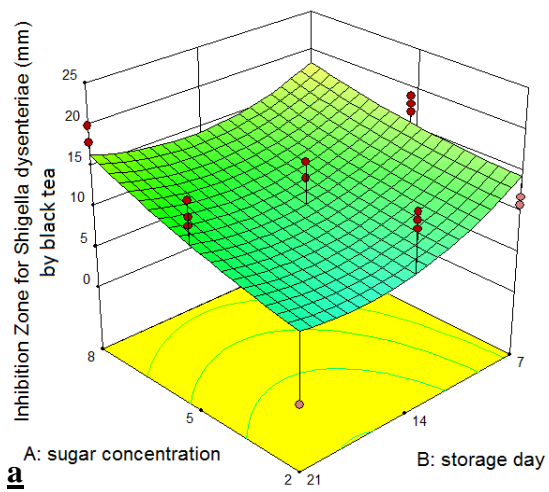
جدول ۳. مقادیر p-value و پارامترهای مستخرج از جدول آنالیز واریانس برای عوامل تاثیرگذار بر فعالیت ضدباکتریایی دمنوش‌های گیاهی

| منبع | pH | شیکلا دیسانتری | استافیلوکوکوس اورئوس | باسیلوس سرئوس |
|-----------------|-------------|----------------|----------------------|---------------|
| مدل | 3.16E-37*** | 1.25E-10*** | 1.69E-23*** | 1.66E-70*** |
| A: غلظت ساکارز | 0.65 | 0.05* | 0.401 | 0.49 |
| B: زمان نگهداری | 0.26 | 0.166 | 6.23E-13*** | 0.86 |
| C: نوع گیاه | 7.48E-43*** | 8.53E-10*** | 7.04E-21*** | 7.04E-77*** |
| AB | 0.399 | 0.05* | 0.0013** | 0.83 |
| AC | 0.204 | 0.031* | 0.0124* | 0.69 |
| BC | 0.015* | 0.0019** | 4.91E-06*** | 0.99 |
| A^2 | 0.135 | 0.28 | 0.0017** | 0.166 |
| B^2 | 0.356 | 0.00015*** | 0.139 | 0.92 |
| فقدان برازش | 0.980 | 1.96E-33*** | 2.58E-47*** | 4.82E-12*** |
| R-Sq | 0.884 | 0.53 | 0.76 | 0.98 |
| Adj R-Sq. | 0.866 | 0.470 | 0.732 | 0.97 |
| Pred R-Sq. | 0.850 | 0.403 | 0.688 | 0.97 |
| Adeq Precision | 22.04 | 11.70 | 15.59 | 40.24 |

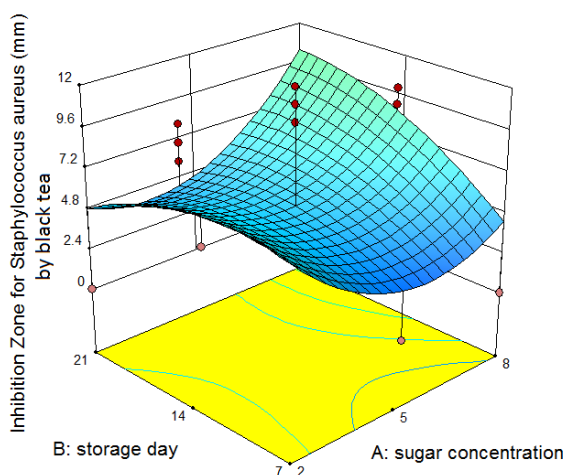
*** $P \leq 0.001$, ** $P \leq 0.01$, * $P \leq 0.05$



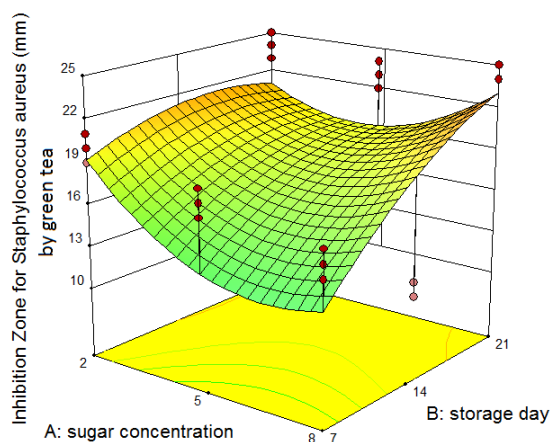
شکل ۱. تغییرات سطوح pH در دمنوش های گیاهی تهیه شده با چای سیاه (a)، چای سبز (b)، به لیمو (c) و نعناع (d)



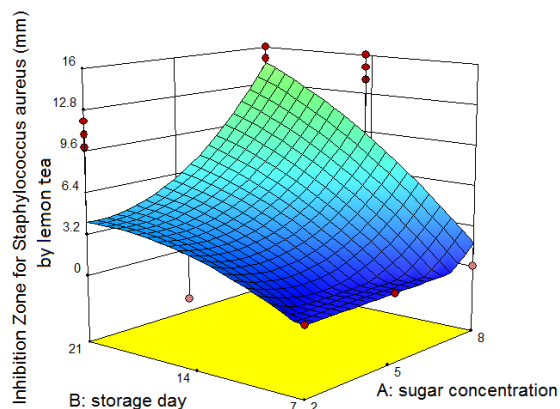
شکل ۲. قطر هاله عدم رشد شیکلا دیسانتری در دمنوش های گیاهی تهیه شده با چای سیاه (a)، چای سبز (b)، به لیمو (c) و نعناع (d)



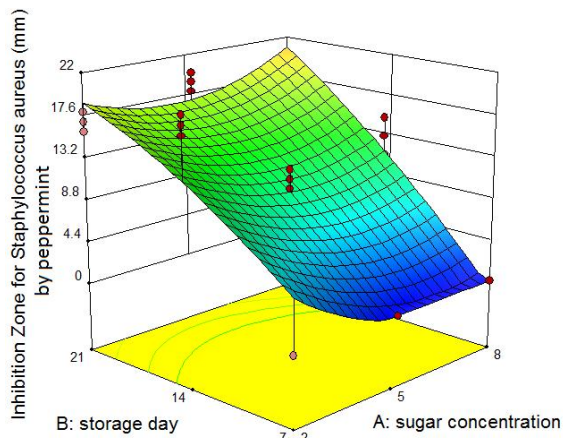
a



b

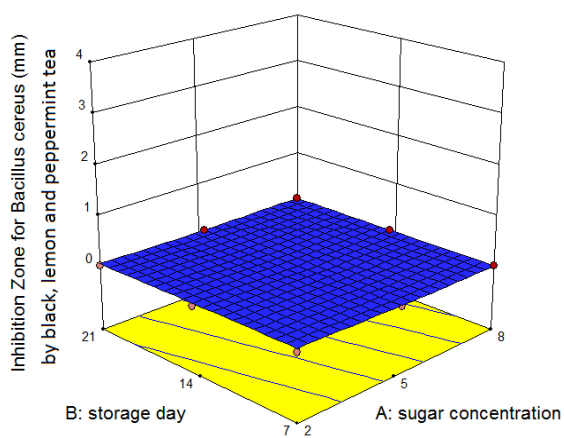


c

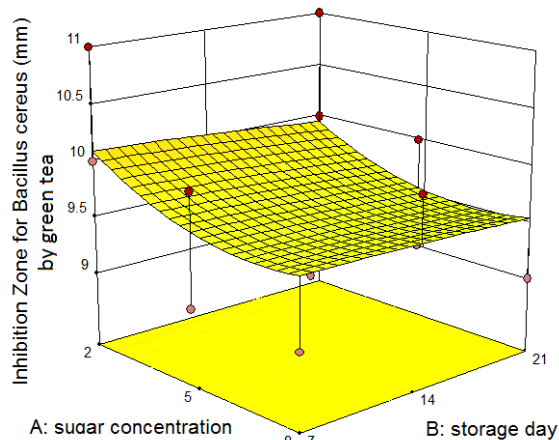


d

شکل ۳. قطر هاله عدم رشد استافیلوکوکوس اورئوس در دمنوش های گیاهی تهیه شده با چای سیاه (a)، چای سبز (b)، به لیمو (c) و نعناع (d)



a



b

شکل ۴. قطر هاله عدم رشد باسیلوس سرئوس در دمنوش های گیاهی تهیه شده با چای سیاه، به لیمو و نعناع (a)، چای سبز (b)

نشان داد. لذا این دمنوش و شرایط مذکور برای حصول به بیشترین فعالیت ضد شیگلا دیسانتری توصیه می شود. همچنین دمنوش تهیه شده با چای سبز و با غلظت ۲ درصد ساکارز بعد از ۲۱ روز نگهداری بیشترین فعالیت ضدباکتریایی را علیه استافیلوکوکوس اورئوس با میانگین قطر هاله عدم رشد ۲۳ میلی متر نشان داد. لذا برای حصول به بیشترین فعالیت ضد باکتریایی علیه استافیلوکوکوس اورئوس این دمنوش و شرایط ذکر شده پیشنهاد می شود.

در خصوص باکتری باسیلوس سرئوس، دمنوش گیاهی تهیه شده با چای سبز با ۲ درصد ساکارز و پس از ۷ روز نگهداری بیشترین فعالیت ضدباکتریایی را با میانگین قطر هاله عدم رشد ۱۰ میلی متر نشان داد و برای معرفی یک نوشیدنی با بیشترین فعالیت ضد باسیلوس سرئوس این دمنوش گیاهی و شرایط مذکور پیشنهاد می شود (جدول ۴).

تعیین مقادیر بهینه شرایط تهیه جهت حصول به بهترین فعالیت ضدباکتریایی دمنوش های گیاهی

همانطور که گفته شد یکی از قابلیت های روش سطح پاسخ، جستجوی شرایط مطلوب برای پاسخ مطلوب و معرفی بهترین فرمول و شرایط برای حصول به نتایج مطلوب با حداقل تعداد آزمایشات است.

جدول ۴ بیشترین فعالیت ضدباکتریایی دمنوش های گیاهی شیرین شده را علیه هر یک از باکتری های مورد آزمون نشان می دهد. همانطور که مشاهده می شود دمنوش تهیه شده با چای سبز بیشترین فعالیت ضد باکتریایی را علیه تمام باکتری های مورد آزمون نشان داد. بطوریکه دمنوش گیاهی تهیه شده با چای سبز با ۸ درصد ساکارز پس از ۲۱ روز نگهداری بیشترین فعالیت ضدباکتریایی را علیه باکتری گرم منفی شیگلا دیسانتری با میانگین قطر هاله عدم رشد ۲۴/۵ میلی متر

| باکتری | غلظت ساکارز (درصد) | زمان نگهداری | نوع گیاه | pH | قطر هاله عدم رشد (میلیمتر) |
|----------------------|--------------------|--------------|----------|-----|----------------------------|
| شیگلا دیسانتری | ۸ | ۲۱ | چای سبز | ۵/۶ | ۲۴/۵ |
| استافیلوکوکوس اورئوس | ۲ | ۲۱ | چای سبز | ۵/۶ | ۲۳ |
| باسیلوس سرئوس | ۲ | ۷ | چای سبز | ۵/۷ | ۱۰ |

بحث

نتایج این تحقیق نشان داد نوع گیاه در فعالیت ضدباکتریایی دمنوش های گیاهی علیه باکتری های مورد آزمون تاثیر معناداری دارد ($P < 0/001$) و در بین دمنوش های تهیه شده، چای سبز بیشترین فعالیت ضدباکتریایی را علیه باکتری های مورد آزمون نشان داد.

گیاهان دارای ترکیبات شیمیایی متعددی از جمله ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها، آلکالوئیدها، ترپنوئیدها

وتانن ها هستند که دارای خواص ضد میکروبی می باشند (۷). دمنوش های گیاهی مانند چای سیاه، سبز، نعنای، مریم گلی و آویشن به طور گسترده برای محافظت و درمان بیماری های انسانی در سراسر جهان استفاده می شود. مشخص است که چای ها، به ویژه آنهایی که حاوی کاتچین هستند، بسیاری از توانایی های سلامتی مانند ضد باکتری، ضد قارچ و ضد ویروسی را دارند (۳).

ویژسوندارا و واسانتا روپاسینگ (Wijesundara and Vasantha Rupasinghe) در مطالعه ای در سال ۲۰۱۹

دمنوش به واسطه حضور ترکیبات ضد میکروبی در ترکیبات ذاتی گیاه می تواند فعالیت ضد میکروبی این نوشیدنی ها را باعث شود.

دمنوش های تهیه شده با چای سبز بیشترین فعالیت ضد باکتریایی را علیه تمام باکتری های مورد آزمون نشان داد. کیم (Kim) و همکاران نیز در مطالعه فعالیت ضد باکتریایی چند نوع چای علیه چند پاتوژن گوارشی، فعالیت ضد باکتریایی قابل توجه چای سبز را در مقایسه با دیگر دمنوش ها گزارش کردند (۱۳). این اثر ممکن است به دلیل ترکیبات طبیعی موجود در چای سبز همچون کاتچین ها شامل اپی گالوکاتچین گالات، اپی گالوکاتچین، اپی کاتچین گالات، اپی کاتچین و گالوکاتچین باشد (۱۹ و ۲۰).

کاتچین ها مهمترین ترکیبات موجود در چای هستند که اثرات بیولوژیک این گیاه به آنها مربوط می شود. کاتچین های شامل حداقل چهار ترکیب فنلی اصلی شامل اپی گالوکاتچین، اپی کاتچین گالات، اپی گالوکاتچین گالات و اپی کاتچین می باشند که فراوان ترین آنها در چای سبز اپی گالوکاتچین گالات می باشد که حدود ۵۰ درصد کاتچین های چای را شامل می شود. ترکیبات کاتچین های چای ممکن است طی فرایندهای تخمیر و اکسیداسیون تغییر نماید. پلی فنول های اصلی در چای سیاه تئاروبیجین ها (Thearubigins) و تئافلایین ها (Theaflavins) هستند. تئافلایین ها ترکیبات قرمز نارنجی هستند که باعث طعم گس و رنگ مسی چای سیاه می شوند. اگرچه تئاروبیجین ها به فراوانی در چای سیاه وجود دارند، اما ماهیت و ساختار شیمیایی آنها تا حد زیادی ناشناخته است. آنها محلول در آب، اسیدی و اغلب قهوه ای زنگ زده با ساختارهای دایمری، تریمری تا تترامری با وزن مولکولی ۲۰۰۰-۷۰۰۰ دالتون می باشند. پلی

به مطالعه فعالیت ضد باکتریایی ۱۳ دمنوش گیاهی علیه عفونت های گلودرد چرکی استرپتوکوکی پرداختند. آنها نتیجه گرفتند که دمنوش های تهیه شده از ریشه شیرین بیان، ریشه زرشک، آویشن و شاخه های گل گیاه پونه کوهی منابع بالقوه برای توسعه چای های گیاهی یا زیست پزشکی برای مدیریت عفونت های استرپتوکوکوس پیوژنز هستند (۲۶).

هاکیگلو (Hacioglu) و همکاران با هدف بررسی فعالیت ضد میکروبی ۳۱ دمنوش، نشان دادند که دمنوش های گیاهی مورد آزمون به تنهایی دارای فعالیت ضد میکروبی علیه باکتری های گرم مثبت و گرم منفی هستند و ترکیب دمنوش ها با آنتی بیوتیک ها، بسته به آنتی بیوتیک یا نوع چای، اثرات سینرژیستی و یا اثرات آنتاگونیستی نشان داد. در این بین دمنوش های گل سرخ، شکوفه انار، آویشن، افسنطین، نعنای چای اکیناسه، دارچین، چای سیاه و چای سبز علیه اکثر میکروارگانیسم های مورد مطالعه فعالیت ضد باکتریایی را نشان دادند. در نتیجه، استفاده از دمنوش های گیاهی به تنهایی یا همراه با برخی از عوامل ضد میکروبی شیمیایی می تواند یک درمان جایگزین مؤثر علیه برخی از میکروارگانیسم های بیماریزا باشد. علاوه بر این، چای های گیاهی به تنهایی یا به همراه ترکیبات ممکن است به کاهش شدت بیماری کمک کند. با این حال، برخی از ترکیبات با آنتی بیوتیک می توانند اثر آنتی بیوتیک اولیه را کاهش دهند و بنابراین نباید در کنار هم استفاده شوند (۱۰).

همانطور که گفته شد در بین متغیرهای مستقل مورد آزمون، نوع چای (گیاه) مورد استفاده در تهیه دمنوش، در فعالیت ضد باکتریایی دمنوش های گیاهی شیرین شده علیه باکتری های مورد آزمون تاثیر معناداری داشته است ($P < 0/001$). نوع گیاه مورد استفاده در تهیه

علاوه بر کاتچین ها، کافئین، اسید کلروژنیک، اسید گالیک، تئوبرومین، تنوفیلین از دیگر ترکیبات ضد میکروبی چای می باشند. تانن نیز یکی از پلی فنول های چای می باشد که فعالیت باکتریوسیدی و باکتریواستاتیکی آن علیه *استافیلوکوکوس اورئوس*، *شیگلا دیساتتری*، *باسیلوس آتتراسیس*، *استریتوکوکوس پنومونیه* و *سالمونلا انتریکا* گزارش شده است (۱۲ و ۲۸). اختلاف در حساسیت باکتری های بیماریزا نسبت به چای به نوع گونه و سویه باکتری وابسته است (۲۵).

فعالیت ضدباکتریایی مشاهده شده در دیگر دمنوش ها را نیز می توان به وجود ترکیبات ضد میکروبی ذاتی آنها نسبت داد. ترکیباتی همچون فنیل پروپانوید با ورباسکوزید به عنوان فراوان ترین ترکیبات موجود در گیاه به لیمو و دیگر ترکیبات همچون ایریدوئید، وربنالین همراه با فلونوئیدها، لوتولین و آپیزین که در گیاه به لیمو شناسایی شده است (۴).

یادگارنیا (*Yadegarnia*) و همکاران نیز در مطالعه فعالیت های بیوشیمیایی و ضدباکتریایی اسانس برگ های نعناع، مهمترین ترکیبات اسانس برگ های نعناع جمع آوری شده از ایران، آلفا ترپینن، ایزومنتون، ترانس کاروئول، بتاکاریوفیلین و اکسید پیریتینون معرفی کردند و فعالیت ضدباکتریایی نعناع (*Mentha piperita*) را علیه *کاندیدا آلبیکانس*، *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* را ثابت کردند (۲۷).

تخریب دیواره سلولی، از بین رفتن یکپارچگی غشای سلولی به دلیل اختلال در غشاء دو لایه فسفولیپید، مهار سنتز پروتئین و DNA/RNA به عنوان مکانیسم بالقوه ترکیبات فیتوشیمیایی بر فعالیت های ضدباکتریایی آنها محسوب می شود (۲۶).

فنول های چای نیز به دلیل فعالیت ضد باکتریایی آنها شناخته شده اند. به طور کلی، فعالیت ضدباکتریایی با افزایش میزان تخمیر چای کاهش می یابد که حاکی از فعالیت قوی تر در چای سبز نسبت به چای سیاه است. معمولاً محتوای کاتچین های چای سبز حدود ۳۰-۱۳ درصد است که این مقدار در چای سیاه حدود ۵ درصد است و در عوض محتوای ترکیبات فنلی اکسید شده در چای سیاه ۲۵ درصد می باشد. ترکیب کاتچین چای سیاه که تحت تخمیر گسترده قرار می گیرد با ترکیب چای سبز تفاوت دارد. بنابراین، مقدار بیشتری از کاتچین های چای طبیعی معمولاً در چای سبز حفظ می شود که فرایند تخمیر کمتری را طی می کند. مکانیسم اثر کاتچین های چای در فعالیت ضد باکتریایی ناشی از تاثیر این ترکیبات بر غشاء سلولی و دیواره سلولی باکتری های می باشد (۲۳ و ۵).

تمایل بالای اتصال کاتچین های چای به ترکیبات دیواره سلولی باکتری ها باعث فعالیت ضدباکتریایی آنها می شود. تفاوت در حساسیت *استافیلوکوکوس اورئوس* و باکتری های گرم منفی نسبت به کاتچین ها به میزان این اتصال ارتباط دارد (۲۹). این فعالیت ضدباکتریایی با جایگزین شدن گروه گالات کاتچین ها تقویت می شود (۲۴).

اثر ضد میکروبی کاتچین های چای بر علیه *باسیلوس سرئوس* در سطح نانومولار حتی بالاتر از تتراسایکلین و وانکومایسین گزارش شده است که استفاده از چای سبز را در درمان مسمومیت غذایی مطرح می سازد (۹).

کیم (Kim) و همکاران در مطالعه اثر حرارت بر فعالیت ضد میکروبی چای سبز، به افزایش اثرات ضدباکتریایی کاتچین های چای سبز پس از تیمار حرارتی اشاره نمودند (۱۲).

7. Cowan, M.M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* **12**: 564-582.
8. Dubick, M.A. (1986). Historical perspectives on the use of herbal preparations to promote health. *The Journal of Nutrition* **116**: 1348-1354.
9. Friedman, M., Henika, P.R., Levin, C.E., Mandrell, R.E., Kozukue, N. (2006). Antimicrobial activities of tea catechins and theaflavins and tea extracts against *Bacillus cereus*. *Journal of Food Protection* **69**: 354-361.
10. Hacioglu, M., Dosler, S., Birteksoz Tan, A.S., Otuk, G. (2016). Antimicrobial activities of widely consumed herbal teas, alone or in combination with antibiotics: an in vitro study. *Peer J* **5**:1-17.
11. Khosravi, A.D., Mohammadian, A. (2016). Efflux MexAB-mediated resistance in multidrug and pan-drug resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with burn and wound infections. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products* **11**: e25352.
12. Kim, E.S., Liang, Y.R., Jin, J., Sun, Q.F., Lu, J.L., Du, Y.Y., Lin, C. (2007). Impact of heating on chemical compositions of green tea liquor. *Food Chemistry* **103**: 1263-1267.
13. Kim, S., Ruengwilysup, C., Fung, D.Y.C. (2004). Antibacterial Effect of Water-Soluble Tea Extracts on Foodborne Pathogens in Laboratory Medium and in a Food Model. *Journal of Food Protection* **67**: 2608-2612.
14. Koohsari, H., Ghaemi, E.A., Sadegh Shesh Poli, M., Sadegh, A. (2013). Evaluation of antibacterial activity of *Lemon verbena* (*Lippia citriodora*) leaves. *Annals of Biological Research* **4**: 52-55.
15. Martis, N., Leroy, S., Blanc, V. (2014). Colistin in multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* blood-stream infections a narrative review for the clinician. *Journal of Infection* **69**: 1-12.
16. McKay, D.L., Blumberg, J.B. (2006). A review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (*Mentha piperita* L.). *Phytotherapy Research* **20**: 619-633.
17. Moderno, P.M., Carvalho, M., Silva, B.M. (2009). Recent patents on *Camellia*

نتیجه گیری

در بین متغیرهای مورد آزمون، نوع گیاه مورد استفاده در تهیه دمنوش، در فعالیت ضدباکتریایی دمنوش‌های گیاهی شیرین شده علیه باکتری‌های مورد آزمون تاثیر معناداری داشت. در بین دمنوش‌های گیاهی تهیه شده، چای سبز بیشترین فعالیت ضدباکتریایی را علیه تمام باکتری‌های مورد آزمون نشان داد. این موضوع را می‌توان به پتانسیل ضد میکروبی ترکیبات ذاتی این گیاه نسبت داد.

منابع

1. Akova, M. (2016). Epidemiology of antimicrobial resistance in bloodstream infections. *Virulence* **7**: 252-266
2. An, B.J., Kwak, J.H., Son, J.H. (2004). Biological and anti-microbial activity of irradiated green tea polyphenols. *Food Chemistry* **88**: 549-555.
3. Bansal, S., Choudhary, S., Sharma, M., Kumar, S.S., Lohan, S., Bhardwaj, V., Syan, N., Jyoti, S. (2013). Tea: a native source of antimicrobial agents. *Food Research International* **53**: 568-584.
4. Bilia, A.R., Giomi, M., Innocenti, M., Gallori, S., Vincieri, F.F. (2008). HPLC-DAD-ESI-MS analysis of the constituents of aqueous preparations of verbena and lemon verbena and evaluation of the antioxidant activity. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **13**: 463-470.
5. Chan, E.W.C., Soh, E.Y., Tie, P.P., Law, Y.P. (2011). Antioxidant and antibacterial properties of green, black, and herbal teas of *Camellia sinensis*. *Pharmacognosy Research* **3**: 266-272.
6. Cockerill, F.R., Wikler, M.A., Alder, J., Dudley, M.N., Eliopoulos, G.M., Ferraro, M.J., Hardy, D.J., Hecht, D.W., Hindler, J.A., Patel, J.B., Powell, M., Swenson, J.M., Thomson, R.B., Traczewski, M.M., Turnidge, J.D., Weinstein, M.P., Zimmer, B.L. (2012). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard. CLSI document M07-A9.9. 9 ed. C.L.S.I. (Clinical and Laboratory Standard Institute), Pennsylvania, PA, USA. **32**(1).

- communis* L. essential oils. *Phytochemistry* **67**: 1249-1255.
28. Yam, T.S., Shah, S., Hamilton-Miller, J.M. (1997). Microbiological activity of whole and fractionated crude extracts of tea (*Camellia sinensis*), and of tea components. *FEMS Microbiology Letters* **152**: 169-174.
29. Yoda, Y., Hu, Z.Q., Zhao, W.H., Shimamura, T. (2004). Different susceptibilities of *Staphylococcus* and Gram-negative rods to epigallocatechin gallate. *Journal of Infection and Chemotherapy* **10**: 55-58.
- sinensis*: source of health promoting compounds. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture* **1**: 182-192.
18. Moreira, D.L., Teixeira, S.S., Monteiro, M.H.D., De-Oliveira, A.C.A.X., Paumgarten, F.J.R. (2014). Traditional use and safety of herbal medicines. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **24**: 248-257.
19. Noormandi, A., Dabaghzadeh, F. (2015). Effects of green tea on *Escherichia coli* as a uropathogen. *Journal of Traditional Complementary Medicine* **5**: 15-20.
20. Oyeboode, O., Kandala, N.B., Chilton, P.J., Lilford, R.J. (2016). Use of traditional medicine in middle-income countries: A WHO-SAGE study. *Health Policy and Planning* **31**: 984-991.
21. Patel, S.H. (2005). *Camellia sinensis*: historical perspectives and future prospects. *Journal of Agromedicine* **10**: 57-64.
22. Rashrash, M., Schommer, J.C., Brown, L.M. (2017). Prevalence and predictors of herbal medicine use among adults in the United States. *Journal of Patient Experience* **4**: 108-113.
23. Song, J.M., Seong, B.L. (2007). Tea catechins as a potential alternative anti-infectious agent. *Expert Review of Anti-infective Therapy* **5**: 497-506.
24. Stapleton, P.D., Shah, S., Hamilton-Miller, J.M., Hara, Y., Nagaoka, Y., Kumagai, A., Uesato, S., Taylor, P.W. (2004). Anti-*Staphylococcus aureus* activity and oxacillin resistance modulating capacity of 3-O-acyl-catechins. *The International Journal of Antimicrobial Agents* **24**: 374-380.
25. Toda, M., Okubo, S., Hiyoshi, R., Shimamura, T. (1989). The bactericidal activity of tea and coffee. *Letters in Applied Microbiology* **8**: 123-125.
26. Wijesundara, N.M., Vasantha Rupasinghe, H.P. (2019). Herbal Tea for the Management of Pharyngitis: Inhibition of *Streptococcus pyogenes* Growth and Biofilm Formation by Herbal Infusions. *Biomedicines* **7**: 1-19.
27. Yadegarinia, D., Gachkar, L., Rezaei, M.B., Taghizadeh, M., Astaneh, S.A., Rasooli, I. (2006). Biochemical activities of Iranian *Mentha piperita* L. and *Myrtus*