فصلنامه علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران
سال اول، شماره۳، زمستان ۱۳۸۵، صفحات ۳۳ تا ۳۸

مطالعهٔ اثر مهاری چای سیاه و چای سبز(Camellia sinensis) بر رشد باکتری اشریشیاکلی بیماریزا در محیط آزمایشگاه (*in vitro*)

نیلوفر خلجی[۱]، تیرنگ نیستانی[۲]

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

تاریخ دریافت: ۸۵/۸/۱۵ تاریخ پذیرش: ۸۵/۱۱/۲۵

چکیده

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

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

یافته ها: عصاره‌های چای سیاه و سبز به طور انتخابی و وابسته به دوز روی آنتی‌بیوتیک‌ها اثرات هم افزاینده یا مهاری داشتند. توان آنتی‌اکسیدانی عصارهٔ چای سبز در مقایسه با عصارهٔ چای سیاه به طرز معنی‌داری بالاتر بود.

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

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

• مقدمه

استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها، هستهٔ اصلی درمان در عفونتهای باکتریایی را تشکیل می‌دهد، ولی به دلیل افزایش روزافزون مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌ها و وجود عوارض جانبی داروها، کاربرد یک روش کمکی برای درمان این عفونتها اهمیت ویژه‌ای پیداکرده است. امروزه، استفاده از عصاره‌های گیاهی برای درمان کمکی عفونتهای میکروبی، توجه بسیاری از پژوهشگران را به خود معطوف کرده است. چای (Camellia sinensis) یکی از پرُمصرف‌ترین نوشیدنیها در سراسر جهان و بویژه ایران است که حاوی پلی‌فنل‌هایی نظیر فلاوین و تیرابیجین است. در مطالعه‌ای در سال ۱۹۹۹ مشخص شد که کاتکین‌ها شامل کاتکین، اپی‌گالوکاتکین، اپی‌کاتکین گالات و اپی‌گالوکاتکین موجود در چای سبز، مانع آزاد شدن نوعی زهرابه به نام وروتوکسین

Archive of SID
www.SID.ir

(verotoxin) از اشریشیاکلی انتروهموراژیک و در نتیجه، مهار بیماریزایی این باکتری می‌شود. این اثر درمورد پلی‌فنل‌های گیاهی نیز گزارش شده است(۲،۱).

همچنین در مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۱ مشخص شد که اپی‌گالوکاتکین گالات چای باعث کاهش انتقال پلاسمید بیماریزایی Eolic600 بین R222 (دهنده) و Rc85 (گیرنده) Ecoli k12 می‌شود (۳).

در پژوهش دیگری اثرات ضد باکتریایی انواع پلی‌فنل بر چندین گونه باکتری بیماریزا از جمله E.coli بررسی شد، کمترین غلظت مهاری(MIC)[1] برای E.coli چندین برابر باکتری های دیگر مانند استافیلوکوکوس اورئوس (به ترتیب ۹۴۹±۱۵۱۹ و ۹۱ ±۱۹۲ میکروگرم در میلی‌لیتر) و حتی بیش از سالمونلا (۵۹۰µg/ml ±۷۹۵) بود. پژوهشگران چنین نتیجه گرفتند که احتمالاً وجود گروههای ۳، ۴، ۵- تری هیدروکسی فنیل مولکول پلی‌فنل در خواص ضد میکروبی آن نقش دارد (۴). از آنجا که تا به‌حال چنین مطالعه‌ای در ایران صورت نگرفته است، و با توجه به مصرف بالای چای بویژه چای سیاه درکشور ما وشیوع عفونتهای ناشی از E.coli، در این مطالعه بر آن شدیم تا اثر مهاری چای سیاه و سبز را روی باکتری Ecoli بررسی نمائیم.

• مواد و روشها

در این مطالعهٔ تجربی، سویهٔ خالص باکتری انتروپاتوژن E.coli (ATCC: 25920) از سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران تهیه شد. برای تهیهٔ عصاره به روش پرکولاسیون، ۱۰۰ گرم چای (سیاه یا سبز) به یک ارلن مایر، منتقل و ۲ لیتر اتانول ۷۰٪ به آن اضافه شد. پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون در ۶۰°C، عصاره از کاغذ صافی عبور داده شد و تفاله، فشرده شد تا عصاره کاملاً خارج شود. با افزودن اتانول به تفاله، مراحل قبل تکرار شد. سپس با استفاده از دستگاه تبخیرکننده عصاره، تغلیظ و حجمش به ۲۰ml رسانده شد. عصارهٔ تغلیظ شده با انکوباسیون در ۵۰°C کاملاً خشک و سپس با کاردک تراشیده و در هاون ساییده شد. از عصارهٔ خشک، محلول ۲۵۰mg/ml در دی متیل سولفوکسید (DMSO) تهیه و از آن غلظتهای ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۰ و ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر محیط تیوگلیکولات آماده شد.

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

در روش Pour plate ابتدا غلظتهای مختلف عصاره‌های چای سبز و سیاه در محیط تیوگلیکولات تهیه شد (حجم نهایی ۱۰ml) سپس ۱ml از سوسپانسیون باکتریایی، معادل استاندارد ۰/۵ مک فارلند MacFarland (۱×۱۰^{۸} CFU/ml) به غلظتهای تهیه شده از عصاره‌های چای افزوده و در ۳۷°C انکوبه شد. پس از گذشت ۷،۵،۳،۲،۱ و ۲۴ ساعت، ۱ml از این لوله‌ها به پلیت استریل، منتقل و ۱۰ml از محیط آگار مغذی ذوب شده در ۴۵°C (به پلیت‌های حاوی E.coli) افزوده شد. پس از پخش یکنواخت باکتری در محیط، همه پلیت‌ها در دمای ۳۷°C انکوبه شدند و نتایج پس از گذشت ۲۴ ساعت قرائت شد.

برای تهیه دیسک‌های عصارهٔ چای سیاه و سبز، مقدار ml ۲۵ از غلظتهای ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از سه ماده فوق الذکر به دیسک‌های بلانک (از شرکت پادتن طب) یا دیسک‌های آنتی‌بیوتیک (شرکت پادتن طب) تلقیح شد. دیسک‌ها به مدت یک ساعت در انکوباتور ۳۷°C گذاشته شدند تا خشک شوند. سپس، اثر دیسک‌های حاوی عصاره چای سبز و سیاه، به تنهایی یا با آنتی‌بیوتیک با دیسک‌های استاندارد آنتی‌بیوتیک مقایسه شد. دیسک‌های آنتی‌بیوتیک مورد استفاده برای باکتری E.coli عبارت بودند از:

[1]- minimum inhibitory concentration

Archive of SID

www.SID.ir

آمیکاسین (۳۰µg/disk)، سولفومتاکسازول (۱۰µg/disc)، نوروفلوکسازین (۱۰µg /disc) و جنتامایسین (۱۰µ g/disc).

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

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

تحلیل آماری: نرمال بودن توزیع داده ها با استفاده از آزمون کولموگروف- اسمیرنوف ارزیابی شد. میانگین داده‌ها میان چند گروه با آزمون آنالیز واریانس و سپس بین دو گروه با آزمون توکی مقایسه شد. در موارد توزیع غیرنرمال به ترتیب از آزمونهای کروسکال - والیس و سپس من وتینی- ویلکاکسون استفاده شد. کلیهٔ اختلافها در $p<۰/۰۰۵$ معنی‌دار تلقی شد. همه آزمونهای آماری با استفاده از نرم افزار SPSS11.5 انجام شد.

• یافته ها

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

برای مطالعه اثرات متقابل و احتمالاً هم افزایندهٔ عصاره‌های چای سیاه و سبز و آنتی‌بیوتیک‌ها با توجه به نتایج روش pour plate فقط از عصاره‌های چای سبز و سیاه در دو غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر استفاده شد.

جدول ۱- اثر عصارهٔ چای سیاه برروی تعداد پرگنه های E.coli در زمانها و غلظتهای مختلف

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

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

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

اثر عصاره‌های چای سبز و سیاه بر خواص ضد باکتریایی آنتی‌بیوتیک‌ها در برابر E.coli نسبت به مقدار و نوع آنتی‌بیوتیک متفاوت بود. به این ترتیب که عصارهٔ چای سبز، قطر هالهٔ مهار رشد را در آمیکاسین و جنتامایسین به طرز معنی‌داری افزایش می‌داد ($p<۰/۰۰۱$) و با افزایش مقدار عصاره، این اثر سینرژستیک نیز به‌طرز معنی‌داری افزایش می‌یافت ($p<۰/۰۰۱$). اما افزودن ۱/۲۵ میلی‌گرم عصاره چای سبز به دیسک دو آنتی‌بیوتیک نورفلوکسازین و سولفومتاکسازول بطرز معنی‌داری، موجب مهار اثر ضد باکتریایی آنها شد ($p<۰/۰۰۱$)؛ اما با افزایش دوز عصاره چای سبز به ۲/۵mg این مهار از میان رفت، به طوری که

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

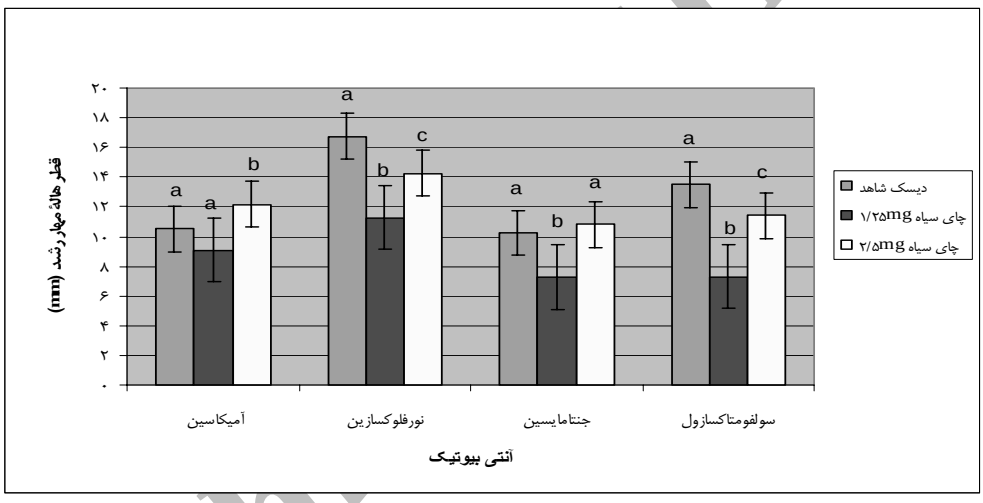
Archive of SID
www.SID.ir

در مورد سولفومتاکسازول، قطر هاله عدم رشد تقریباً به اندازه معمول برگشت و در مورد نوروفلوکسازین، قطر هاله مهار رشد حتی از سطح پایه نیز فراتر رفت (p <۰/۰۰۱).

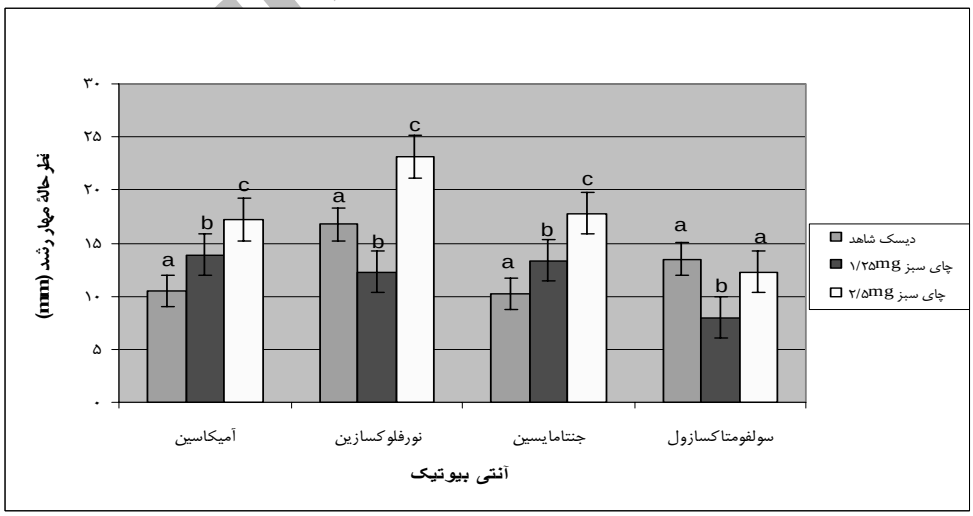
افزودن ۱/۲۵ میلی‌گرم عصارهٔ چای سیاه به آنتی‌بیوتیک‌ها تقریباً در همهٔ موارد، موجب مهار اثر ضد باکتریایی و کاهش قطر هالهٔ مهار رشد شد. این کاهش بجز در مورد آمیکاسین در موارد دیگر، معنی‌دار بود (p <۰/۰۱). با دو برابر کردن دوز عصارهٔ چای سیاه، هر چند این اثر مهاری در نورفلوکسازین و سولفومتوکسازول به طرز معنی‌داری کاهش یافت، اما قطر هالهٔ مهار رشد هم چنان به طرز معنی‌داری از سطح پایه کمتر بود (p <۰/۰۲)، اما درمورد آمیکاسین و جنتامایسین این کار موجب افزایش قطر هالهٔ مهار رشد شد، به طوری که در جنتامایسین تقریباً به سطح پایه برگشت و در آمیکاسین حتی از آن نیز فراتر رفت (p=۰/۰۱۴).

ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی عصاره ۱mg/ml چای سبز معادل ۰/۲۶۸±۰/۱۱ mM BSA و چای سیاه در غلظت مشابه حدود ۱/۲۲±۰/۱۰ mM BSA بود (p <۰/۰۰۱).

(الف)

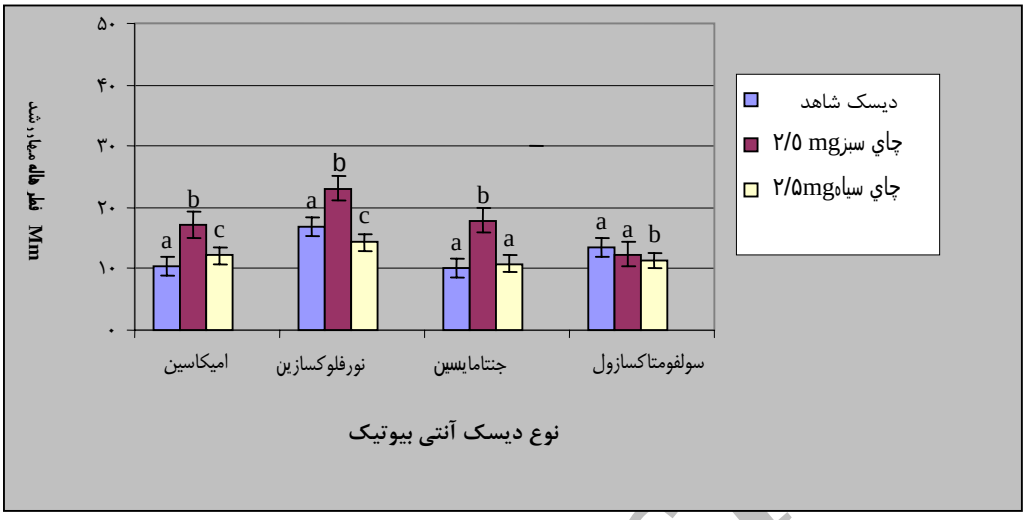


(ب)



شکل ۱- اثر متقابل غلظتهای مختلف عصاره های (الف)چای سیاه و(ب) سبز با برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها روی E.coli به روش آنتی بیوگرام با دیسک.حروف ناهمسان در بالای ستونها نشانگر تفاوتهای معنی‌دار در آن گروه است (p<۰/۰۵).

www.SID.ir



شکل۲- اثر متقابل بالاترین مقادیر مورد آزمایش عصاره های چای سبز و سیاه با برخی از آنتی بیوتیک‌ها روی E.coli

• بحث

تاکنون، گزارشهای متعددی درباره اثرات ضد میکروبی انواع چای (۷) و پلی‌فنل‌های خالص آن (۴) در برابر انواع میکروب‌ها منتشر شده‌اند. اثرات سینرژیسمی چای با آنتی‌بیوتیک‌ها نیز گزارش شده است (۶، ۹). در مطالعه‌ای اثر سینرژیستی عصاره چای و لووفلوکساسین (levofloxacin) بر ضد E.coli انتروپاتوژن مشاهده شد (۶). طبق یافته‌های به‌دست آمده در این مطالعه این اثر در مورد چای سبز، بارزتر بود. به طوری که در آزمون آنتی‌بیوگرام به روش دیسک و در مقدار ۱/۲۵mg روی همه آنتی‌بیوتیک‌ها اثر مهاری داشت. جالب اینکه با افزایش مقدار عصاره به ۲/۵mg این اثر مهاری به درجاتی تخفیف یافت. از جمله علل احتمالی این تاثیر را می‌توان برهم‌کنش اجزای عصارهٔ چای و آنتی‌بیوتیک و نهایتاً مهار اثر دارو در غلظتی خاص یا ناکافی بودن مقدار مواد ضدمیکروبی چای در مقادیر پایین عصارهٔ چای دانست. گفته شده است که پلی‌فنل‌های گیاهی یا اصطلاحاً تانن‌ها (tanins) از طریق اتواکسیداسیون و تولید پراکسید هیدروژن، اثرات مهاری خود را بر رشد یاخته (شامل یاخته‌های میکروبی) اعمال می‌کنند (۱۱)، ولی در شرایط محیطی خاصی امکان دارد ژن‌های خاصی در باکتری القاء شوند، مانند OXYR در E.coli که نهایتاً با افزایش دفاع آنتی‌اکسیدانی در باکتری موجبات غلبه آن را بر اثرات مهاری تانن‌ها فراهم می‌آورند (۱۱). امکان دارد غلظت پلی‌فنل‌ها نیز در این پدیده نقش داشته باشد. با این‌حال، عدم رشد باکتری بعد از ۳ تا ۲۴ ساعت مجاورت با عصاره چای از یک سو و کاهش اثر آنتی‌بیوتیک‌ها بر اثر عصاره خام چای از سوی دیگر، امکان تداخلات غذا و دارو را بیشتر قوت می بخشد.

قوی‌تر بودن اثرات مهاری چای سبز در مقایسه با چای سیاه، این احتمال را مطرح می‌کند که متابولیت‌های حاصل از فرایندهای اکسیداسیون در ضمن تخمیر برگ چای هم اثرات مهاری و هم توان آنتی‌اکسیدانی آن را کم می‌کند. با این‌حال، چای سیاه در پاره‌ای از شرایط همچنان دارای اثرات ضد باکتریایی است و به نظر می‌رسد که این اثرات با ظرفیت آنتی‌اکسیدانی آن مرتبط باشد. به نظر می‌رسدکه مصرف۲ تا ۳ فنجان چای در روز برای بیمارانی که تحت درمان با آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی در این مطالعه هستند، مشکل خاصی را ایجاد نمی‌کند.

سپاسگزاری

این مطالعه، بخشی از یک طرح پژوهشی است که با بودجهٔ انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور انجام پذیرفته است. بدین وسیله از کلیهٔ همکاران آن

Archive of SID
www.SID.ir

مرکز، بـه ویـژه معاونـت محتـرم پژوهـشی سپاسـگزاری می‌شود. پس از سپاس از ایزد منان که ما را در انجام این مطالعـه یـاری نمـود، لازم مـی‌دانـیم از کلیـه همکـاران آزمایشگاه پژوهشهای تغذیه ای گروه تحقیقـات تغذیـه و منشی این گروه سرکارخانم قنبرزاده که کمال همکاری را در اجرای ایـن مطالعـه بـا مـا داشـتند، قـدردانی کنـیم.

• References

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

Archive of SID

www.SID.ir