

بررسی اثرات عصاره چای سیاه (*Comellia sinensis*) بر روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در محیط آزمایشگاه (*in vitro*)

مریم ارشاد لنگرودی^{1*}، مطهره ارشاد لنگرودی²

1- کارشناس ارشد زیست شناسی - میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان

2- دانشجوی دکتری علوم باغبانی - گرایش گیاهان زینتی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران

Email: marvam_ershad@yahoo.com

چکیده:

باکتری استافیلوکوکوس اورئوس از عوامل مهم عفونت های پوستی، بافت های نرم و عفونت های تهاجمی است که از بیمارستان یا جامعه کسب می شوند. امروزه آنتی بیوتیک ها به عنوان درمان کننده اصلی عفونت های باکتریایی هستند ولی به دلیل افزایش مقاومت باکتری ها به آنتی بیوتیک ها و وجود عوارض جانبی آنها، استفاده از عصاره های گیاهی به عنوان روش کمکی درمان مورد توجه محققان قرار گرفته است. اثرات ضد باکتریایی انواع چای و پلی فنل های خالص آن به اثبات رسیده است، همچنین اثر سینرژیک چای با آنتی بیوتیک ها گزارش شده است. هدف از این پژوهش، بررسی اثر مهاری غلظت های مختلف عصاره چای سیاه بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در مقایسه با آنتی بیو تیک های استاندارد می باشد. در این پژوهش عصاره چای سیاه به روش پرکولاسیون، تهیه و خشک شد سپس در دو غلظت 50 و 100 میلی گرم بر میلی لیتر تهیه گردید. باکتری ها به روش Pour plate و با استفاده از غلظت های مختلف عصاره چای سیاه و تست آنتی بیوگرام توسط دیسک های استاندارد آنتی بیوتیک که شامل سیپروفلوکساسین، سفازولین و ونکومایسین بودند مورد آزمایش قرار گرفتند. داده ها به کمک آزمون های آماری و تجزیه واریانس مورد تحلیل و بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده حاصل از این مطالعه نشان داد که عصاره چای سیاه بر روی رشد باکتری استافیلوکوکوس اثر مهار کنندگی وابسته به دوز دارد. همچنین بررسی ها نشان داد که عصاره چای در غلظت 100 mg/ml بیشترین اثر مهار کنندگی را دارد که این اثر مهار کنندگی بیشتر از دیسک های آنتی بیوتیک مورد استفاده در این مطالعه بوده است.

واژگان کلیدی: عصاره چای سیاه، استافیلوکوکوس اورئوس، آنتی بیوگرام، اثر مهاری

مقدمه:

گیاه چای با نام علمی (*Comellia sinensis*) است که از دم کردن برگهای جوان، جوانه ها یا شاخه های فرآوری شده به مدت چند دقیقه در آب جوش نوشیدنی به دست می آید که یکی از رایجترین و مهمترین نوشیدنی های پرمصرف جهان است (Nataro, 2006). چای نوشیدنی پرطرفداری است که در کشورهایی مانند چین، ژاپن و بعضی دیگر از کشورهای شرق آسیا و هند به صورت چای سیاه مصرف می شود (شعاع حسنی و همکاران، 1387). کشت چای در ایران از سال 1319 هجری توسط کاشف السلطنه در شهرستان لاهیجان عملی شد. تولید سالیانه چای در استان گیلان به عنوان اصلی ترین ناحیه تولید چای ایران با بیش از 34 هزار هکتار زمین های کشاورزی چای در حدود 61000 تن است (رض پیمان، 1378). چای یک منبع طبیعی از کافئین، تئوفیلین، تیائین و آنتی اکسیدان هاست، کاتکین نوعی آنتی اکسیدان است که در این گیاه موجود است. مصرف چای باعث تسریع حرکات تنفسی، تسریع گردش خون، احساس تجدید نیرو، گوارش بهتر، تعریق و غیره می شود (معمارزاده و همکاران، 1391).

استافیلوکوکوس اورئوس، یک باکتری گرم مثبت است که در پوست رشد و نمو می کند و در قسمت ابتدایی بینی 25 تا 30 درصد افراد بدون نشانه های بالینی مشخص وجود دارد و به عنوان مهمترین مخازن گسترش آلودگی شناخته می شود (Grundmann et al, 2006). استافیلوکوکوس اورئوس باکتری است که بر روی غشاهای پوست و مخاطی پستانداران، مواد غذایی و محیط یافت می گردد و عامل ایجاد کننده ذات الریه بعد از عفونت های ویروسی است همچنین باعث ایجاد التهاب وریده ها، مننژیت، عفونت دستگاه مجاری ادراری، التهاب موضعی استخوانها، ضایعات سطحی پوست و غیره می باشد (Turkyilmaz et al, 2006). استافیلوکوکوس اورئوس در بین سایر باکتری ها یکی از مهمترین پاتوژن هایی است که باعث مسمومیت غذایی شده و هرساله شمار زیادی از مردم را به این بیماری مبتلا می کند (Adwan et al, 2005, El-Ghodban et al, 2006).

استفاده از آنتی بیوتیک ها هسته اصلی درمان در عفونت های باکتریایی را تشکیل می دهد ولی به دلیل افزایش روز افزون مقاومت آنتی بیوتیکی در باکتریها و وجود عوارض جانبی داروها، کاربرد یک روش کمکی برای درمان این عفونت ها اهمیت ویژه ای پیدا کرده است. امروزه استفاده از عصاره های گیاهی برای درمان کمکی عفونت های میکروبی، توجه بسیاری از پژوهشگران را به خود جلب کرده است (خلجی و همکاران، 1385).

مواد و روش ها:

تهیه عصاره چای:

برای تهیه عصاره به روش پرکولاسیون، صد گرم چای سیاه به یک ارلن مایر منتقل و دو لیتر اتانول 70% به آن اضافه گردید. پس از 48 ساعت انکوباسیون در 60 درجه سانتیگراد، عصاره از کاغذ صافی عبور داده شد و سپس تفاله فشرده شده تا عصاره کاملاً خارج گردد. با افزودن اتانول به تفاله مراحل قبل تکرار شد. سپس با استفاده از دستگاه تبخیر کننده عصاره (تبخیر درخلاء) عصاره تغلیظ و حجم آن ml 20 رسانده شد. عصاره تغلیظ شده با انکوباسیون در 50 درجه سانتیگراد کاملاً خشک و سپس با کاردک تراشیده و در هاون سائیده شد. از عصاره خشک، محلول 250 mg/ml در دی متیل سولفوکسید (DMSO) تهیه شد.

در این پژوهش از سویه های خالص باکتری استافیلوکوکوس اورئوس با ATCC: 29213 استفاده شده است. آزمون حساسیت باکتریایی با دو روش Pour plate و Disk diffusion در برابر غلظت های مختلف عصاره چای مورد ارزیابی قرار گرفت.

روش Pour plate:

در این روش غلظت های مختلف عصاره چای سیاه 50 و 100 میلی گرم بر میلی لیتر در محیط تیوگلیکولات تهیه شد (حجم نهایی 10ml) سپس 1ml از سوسپانسیون باکتریایی معادل استاندارد 0/5 مک فارلند به غلظتهای تهیه شده از عصاره های چای افزوده و در 37 درجه سانتیگراد انکوبه شد. پس از گذشت 1، 2، 3، 5، 7 و 24 ساعت یک میلی لیتر از این لوله ها به پلیت استریل منتقل گردید و 10ml از محیط آگار مغذی ذوب شده در 45 درجه سانتیگراد اضافه شد. پس از پخش یکنواخت باکتری در محیط همه پلیت ها در دمای 37 درجه سانتیگراد انکوبه شد و نتایج رشد یا عدم رشد باکتری روی محیط کشت پس از گذشت 24 ساعت قرائت شد.

روش Disk diffusion:

برای تهیه دیسک عصاره چای سیاه مقدار 25 میکرولیتر از غلظت های 50 و 100 میلی گرم در میلی لیتر عصاره چای سیاه به دیسک های بلانک تلقیح شد. جهت خشک شدن دیسک ها به مدت یک ساعت در دمای 37 درجه سانتیگراد انکوبه شدند. پس از تهیه دیسک های عصاره چای سیاه با استفاده از غلظت های 50 و 100 میلی گرم در میلی لیتر، نمونه باکتری های مورد مطالعه روی محیط کشت با سواب استریل به صورت چمنی کشت داده شد و از محیط مولر هینتون آگار استفاده شد و دیسک های عصاره چای سیاه و دیسک های استاندارد آنتی بیوتیک شامل ونکومایسین (5 میکروگرم)، سفازولین (30 میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (5 میکروگرم) جداگانه روی محیط کشت قرار داده شد سپس پلیت ها داخل انکوباتور در 37 درجه سانتیگراد قرار گرفت و پس از 18 ساعت نتایج حاصل قرائت گردید. قطر

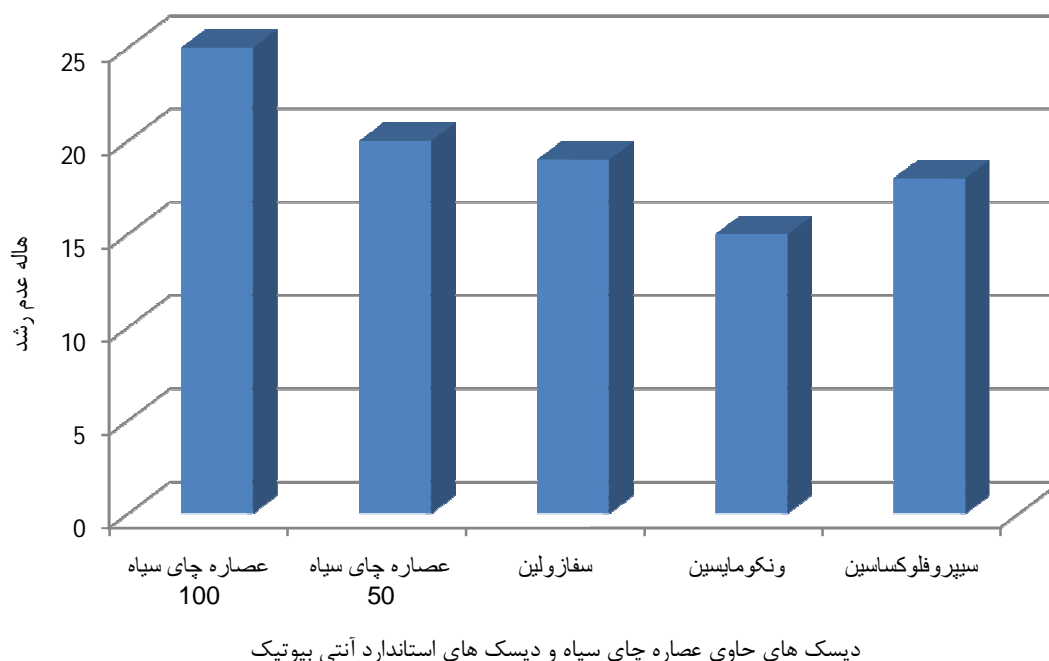
هاله عدم رشد در اطراف دیسک های حاوی عصاره چای و دیسک های استاندارد آنتی بیوتیک بر حسب میلی متر به وسیله خط کش اندازه گیری و ثبت شد و مورد آنالیز آماری قرار گرفت. آزمون های آماری با استفاده از نرم افزار SPSS14 انجام شد.

نتایج:

نتایج به دست آمده از روش Pour plate نشان داد با افزایش غلظت عصاره چای سیاه رشد باکتری های استافیلوکوکوس کاهش می یابد ($P>0/05$). آزمون آنتی بیوگرام به روش دیسک برای دیسک های استاندارد 8 بار انجام شد. سپس از روی قطر هاله های مهار رشد محاسبه و برای آنالیز آماری استفاده شد.

همچنین تجزیه واریانس بین میانگین قطر هاله های عدم رشد آنتی بیوتیک های استاندارد سیپروفلوکساسین، سفازولین و وانکومايسين با دو غلظت مختلف عصاره چای سیاه اختلاف معنی دار را نشان می دهد ($P>0/05$).

نتایج داده ها نشان داد که عصاره چای سیاه با غلظت 100 mg/ml بیشترین تاثیر را بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در مقایسه با آنتی بیوتیک های استاندارد داشته است (نمودار 1). همچنین مقایسه نتایج داده ها نشان داد که عصاره چای سیاه با غلظت 50 mg/ml با آنتی بیوتیک های استاندارد سیپروفلوکساسین، سفازولین و وانکومايسين تفاوت معنی داری نداشته است ($P>0/05$).



نمودار شماره 1: بررسی قطر هاله عدم رشد دیسک های حاوی عصاره چای سیاه و مقایسه آنها با دیسک های استاندارد آنتی بیوتیک با روش Disk diffusion

بحث و نتیجه گیری :

باکتری استافیلوکوکوس اورئوس یکی از علل عمده عفونت های بیمارستانی معرفی شده است. با توجه به معضلاتی که این باکتری در سطح دنیا دارد و دومین عامل ایجاد کننده عفونت در زخم های بعد از جراحی است، انجام پژوهش های مختلف پیرامون این ارگانیسم ضروری است (Wilson et al, 2005 و Coope et al, 2004).

تاکنون گزارش های بسیاری درباره اثرات ضد میکروبی انواع چای (Bandyopadnyay et al, 2005) و پلی فنل های خالص آن (Taguri et al, 2004) در برابر انواع میکروبهها منتشر شده اند. اثرات سینرژیک چای با آنتی بیوتیک ها نیز گزارش شده اند (Isogia et al, 2001).

توط و همکاران در سال 1989 ثابت کردند که عصاره های چای باعث کشتن یا ممانعت از رشد باکتریهای بیماریزایی مانند استافیلوکوک اورئوس، استافیلوکوک اپیدرمایدیس، شیگلا دیسانتری و گونه های ویبئو کلرا می گردد (Toda et al, 1989).

همچنین دیگر پژوهش ها نشان دادند که پلی فنل های برگ های سبز چای اثر مهاری بر رشد اشربشیاکلی، استرپتوکوک ها و استافیلوکوک اورئوس و بوردتلا پوردتوسیس (عامل سیاه سرفه) دارد (Horiuchi et al, 1992).

با توجه به یافته های حاصل از این پژوهش اثر بازدارنده عصاره چای سیاه در شرایط *Invitro* بر رشد باکتری استافیلوکوکوس مشاهده شده است که با سایر پژوهش ها در این زمینه مطابقت دارد. تاثیر عصاره چای سیاه در غلظت 100 mg/ml بیشترین اثر مهارکنندگی را دارد. اثر مهارکنندگی رشد عصاره چای سیاه با غلظت 50 mg/ml در مقایسه با آنتی بیوتیک های سفازولین، سیپروفلوکساسین و ونکومایسین تفاوت معنی داری ندارد.

با توجه به اینکه اثرات ضد باکتریایی چای سیاه عمدتاً به ترکیبات پلی فنلی آنها نسبت داده شده است، پژوهشگران به مطالعه اثرات ضد باکتریایی دیگر پلی فنل های غذایی پرداختند. در مطالعه ای روی پلی فنل های دانه های گیاه پریلا بیشترین اثر ضد باکتریایی روی استرپتوکوکوس موتانس در لوتولین، یکی از پلی فنل های دانه پریلا مشاهده شد. اثرات مهاری پلی فنل های سیب و برخی گیاهان دیگر نیز گزارش شده است (Yanagida, 2000).

با توجه به یافته های حاصل از این پژوهش و مقایسه آن با سایر مطالعات در این زمینه می توان عصاره چای سیاه را در کنترل و مهار رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در شرایط آزمایشگاهی دانست، بدیهی است که استفاده از عصاره چای سیاه با غلظت های مختلف نیازمند پژوهش های بیشتر در این زمینه می باشد.

منابع:

- 1- ارض پیما، ف.ا.، 1378. تاریخچه چای و صنعت چای در ایران، انتشارات سازمان چای ایران، صفحه 220.
- 2- خلجی، ن. نیستانی، ت. 1385. مطالعه اثر مهارى چای سیاه و چای سبز بر رشد باکتری اشريشياکلی بیماريزا در محیط آزمایشگاه، فصلنامه علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران، 1(3)، 33-38.
- 3- شعاع حسنى، ع. اردوزاده، ن. قائمی، ه. نظری، ر. حمدی، ک. حکمت پو، د. 1387. مقایسه اثرات چای سیاه و چای سبز بر رشد و تشکیل بیوفیلیم در میکروارگانيسم های خانواده انتروباکتریاسه، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک، 2(43)، 64-73.
- 4- معمارزاده، ع. ولیدی، م. مبینی، غ. رفیعیان کوپایی، م و منصورى، ش. 1391. بررسی اثر ضد میکروبی عصاره چای سیاه بر روی باکتری های مولد التهاب ملتحمه چشم در شرایط آزمایشگاهی، مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، 4(14)، 61-69.
- 5- Adwan GH, Abu-Shanab B, Adwan K. Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in Raw Milk in the North of Palestine. *Turk J Biol* 2005;29:229-232.
- 6- Bandyopadnyay D, Chatterjee TK, Dasgupta A, Lourduraja J, Dastidar SG. In vitro and in vivo antimicrobial action of tea: The commonest beverage of Asia. *Biol pharm Bull*. 2005; 28: 2125-7.
- 7- Chou CL; Lin LL; Chung KT., (1999). The antibacterial effect of gallic acid and related compounds on *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Food Microbiol*. 48: 125-30.
- 8- Cooper BS, Stone SP, Kibbler CC, Cookson BD, Roberts JA, Medley GF, et al. Isolation measures in the hospital management of the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): systematic review of the literature. *BMJ* 2004; 329(7465): 533-40.
- 9- El-Ghodban A, Ghenghesh KHS, Ma Rialigeti K, Esahli H, Tawil A. PCR Detection of Toxic Shock Syndrome Toxin of *Staphylococcus aureus* from Tripoli, Libya. *J Med Microbiol* 2006;55:179-182.
- 10- Grundmann H, Aires De Sousa M, Boyce J & Tiemersma R. Emergence and resurgence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat. *Lancet* 2006; 368(9538): 874-85.
- 11- 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.
- 12- Isogia E, Hirose k, Hayashik Hayashis O. The in vivo synergy between green tea extract and levofloxacin against enterohemorrhagic *Escherichia coli* 0157 infection. *Curr Microbiol*. 2001; 42: 248-51.
- 13- Nataro JP. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli*: typical pathogens? *Emerg Infect Dis*. 2006 Apr; 12(4): 696.
- 14- Taguri T, Tanakat, Kouno I. Antimicrobial activity of 10 different plant poly phenols against bacteria causing food-borne disease. *Biol pharm Bull*. 2004; 27:1965-9.
- 15- Toda M, Okubo S, Hiyoshi R, Shimamura T. The bactericidal activity of tea and coffee. *Letters in Applied Microbiology* 1989; 8: 123-125.
- 16- Turkyilmaz S, Kaya O. Determination of some Virulence Factors in *Staphylococcus Spp* Isolated from Various Clinical Samples. *Turk J Vet Anim Sci* 2006;30:127-132.
- 17- Wilson J. *Clinical microbiology: an introduction for health-care professionals*. Translated by Khalili MB. Tehran: Cheraghe Danesh; 2005: 70-1 [Book in Persian].
- 18- Yanagida A, Kanda T, Tanabe M, Matsudaira F, Oliveira Cordeiro JG. Inhibitory effects of apple polyphenols and related compounds on cariogenic factors of mutans streptococci. *J Agric Food Chem*. 2000;48:5666-71.